



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102753191 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 24

(21) 申请号 201080063334. 3

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 30

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/264, 892 2009. 11. 30 US

61/345, 219 2010. 05. 17 US

(56) 对比文件

US 5156841 A, 1992. 10. 20,

审查员 曹丙洲

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 07. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2010/000449 2010. 11. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/065923 EN 2011. 06. 03

(73) 专利权人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 曾琦

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 王玉桂

(51) Int. Cl.

A61K 38/02(2006. 01)

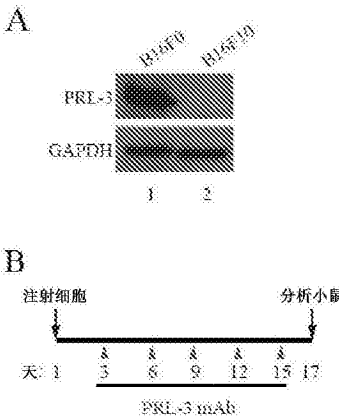
权利要求书1页 说明书54页 附图23页

(54) 发明名称

通过抗体疗法或接种治疗和预防与细胞内癌蛋白相关的癌症

(57) 摘要

我们提供了细胞内抗体疗法的应用,用于靶向细胞内癌蛋白或蛋白以防止癌症转移。我们也提供了包括癌蛋白蛋白的细胞内疫苗疗法在用于接种以刺激宿主产生其自身抗体从而防止肿瘤形成中的应用。抗体可包括嵌合抗体。



1. PRL3在制备用于在患有或疑似患有癌症的人类个体中治疗或预防转移性癌症的药物中的应用,其中,所述转移性癌症与PRL3的过表达相关或由PRL3的过表达引起。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中,所述药物是癌症疫苗。

3. 根据任意前一权利要求所述的应用,其中,所述癌症选自由以下组成的组:肾上腺皮质癌、肛门癌、血癌、骨癌、乳腺癌、女性生殖系统癌、男性生殖系统癌、中枢神经系统淋巴瘤、儿童肉瘤、食道癌、眼癌、胆囊癌、胃肠道癌、头颈癌、卡波西肉瘤、肝癌、肺癌、恶性纤维性组织细胞瘤、恶性胸腺瘤、间皮瘤、神经系统癌、胰腺癌、垂体瘤、皮肤癌、软组织肉瘤或泌尿系统癌。

4. 根据权利要求1所述的应用,其中,与未治疗的个体相比,经治疗的个体中的转移性肿瘤的数量降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

5. 根据权利要求1所述的应用,其中治疗或预防有效量的PRL3被给予所述个体以刺激所述个体产生其自身抗体从而防止转移性肿瘤形成。

6. 根据权利要求1所述的应用,其中,PRL3是人类PRL3。

7. 根据权利要求3所述的应用,其中,所述癌症是白血病、骨髓瘤、宫颈癌、阴道癌、子宫肉瘤、子宫内膜癌、卵巢癌、睾丸癌、阴茎癌、黑色素瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤或维尔姆斯瘤。

8. 根据权利要求7所述的应用,其中,所述白血病是急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病或毛细胞白血病。

9. 根据权利要求3所述的应用,其中,所述癌症是胃癌、直肠癌、结肠癌、小肠癌、肝细胞癌、儿童横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、下咽癌、喉癌、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、甲状旁腺癌、咽癌、唾液腺癌、甲状腺癌、脑瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、浆细胞瘤或沃尔登斯特伦式巨球蛋白血症。

10. 根据权利要求7所述的应用,其中,所述癌症是子宫内膜肉瘤。

通过抗体疗法或接种治疗和预防与细胞内癌蛋白相关的癌症

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞生物学,分子生物学和生物化学领域。本发明还涉及医学领域。特别地,本发明涉及疾病尤其是癌症的预防和治疗,以及用于这样的用途的组合物。

背景技术

[0002] 癌症是过去二十年来认真研究的对象。然而,对造成癌症转移的根本原因知之甚少,并且大多数类型的癌症预防仍然有限。迫切需要预防癌症转移的有效方式。

[0003] 已证实基于抗体的疗法对癌症的治疗有效;然而,该方法通常限于由癌细胞所表达的细胞外或分泌蛋白^{1,2}。

[0004] 因此,文献确定了许多潜在的癌症或肿瘤标志物和癌症抗原,并且抗体疗法由其中某些发展而来。

[0005] 例如,著名的癌症治疗赫赛汀(曲妥珠单抗)为可以杀灭HER2-阳性癌症细胞的单克隆抗体。赫赛汀结合于癌细胞上的HER2(人类表皮生长因子受体2)抗原。同样,贝伐单抗(Avastin™)为靶向血管内皮生长因子(VEGF)的单克隆抗体,所述血管内皮生长因子为一种涉及新血管形成的生长因子。贝伐单抗通过抑制血管发生可防止肿瘤细胞获得持续血液供应并获得肿瘤赖以生存的氧气和营养物。

[0006] 然而,针对不同癌症的抗体疗法的应用并不普遍。阻止抗体疗法的普遍应用的局限性之一为抗体分子的尺寸较大,因而不能穿过细胞质或细胞膜。在未修饰时,抗体(包括单克隆抗体)通常仅适合靶向位于表面或宿主细胞外部的癌症抗原^{14,15}。在以上实例中,HER2受体位于细胞表面,因此易于与赫赛汀发生抗体结合。同样,VEGF分泌至血液中,因此能够与贝伐单抗结合。

[0007] 多数癌蛋白为细胞内蛋白(如细胞内磷酸酶,细胞内激酶,转录因子等),并且仍然未通过抗体疗法的途径充分开发。长期以来抗体太大而不能穿透细胞膜的观点阻碍了靶向细胞内蛋白所采用的抗体治疗技术。

[0008] 因此急需治疗和预防癌症转移的有效途径。由于抗体无法穿过细胞膜而难以接近抗原,因此抗体到目前为止未用于靶向细胞内抗原或癌症标记物。

发明内容

[0009] 我们在实施例中证明可通过抗体疗法或接种来靶向细胞内癌蛋白而预防小鼠中的癌症转移。

[0010] 首先,对野生型C57BL6小鼠静脉内(i.v.)注射B16F0或B16F10黑色素瘤细胞,接着i.v.注射PRL-3单克隆抗体(mAb)显示PRL-3 mAb能够减少由表达内源性PRL-3细胞内磷酸酶的B16F0黑色素瘤细胞形成的肿瘤¹,而不能减少由不表达PRL-3的B16F10黑色素瘤细胞形成的那些肿瘤。

[0011] 其次,对C57BL6小鼠i.v.注射EGFP-B 16F0或EGFP-B16F10细胞,其中对这两个细胞系进行基因工程改造以过表达EGFP,接着i.v.注射EGFP单克隆抗体表明与PRL-3的表达

状态无关,EGFP mAb均能够消灭由EGFP-B 16F0和EGFP-B16F10黑色素瘤细胞系所形成的肿瘤。

[0012] 第三,对多瘤病毒中T(Py-mT)-转基因的年轻雌性i.v注射mT抗体显示mT抗体能够有效降低表达mT的乳腺肿瘤的形成。

[0013] 我们进一步表明使用VHZ蛋白进行免疫可防止癌症的发展。

[0014] 因此我们提供了使用抗细胞内癌蛋白的抗体来治疗癌症及其转移的方法。

[0015] 根据本发明的第一方面,我们提供了抗体疗法在用于靶向细胞内癌蛋白或蛋白以防止癌症转移中的应用。抗体疗法可以为细胞内抗体疗法。

[0016] 根据本发明的第二方面,提供了包括癌蛋白蛋白(癌蛋白蛋白质,癌蛋白质)的疫苗疗法在用于接种以刺激宿主产生自身抗体从而防止肿瘤形成中的应用。

[0017] 疫苗疗法可以为细胞内疫苗疗法。

[0018] 根据本发明的第三方面,我们提供了在患有或疑似患有癌症的个体中治疗癌症如转移性癌症的方法,所述方法包括将治疗有效量的能够与细胞内癌蛋白结合的抗体给予个体。

[0019] 所述抗体能够与细胞内癌蛋白结合,优选地能够穿过细胞的质膜。抗体可包括单克隆抗体或人源化抗体。抗体能够结合于并抑制细胞内癌蛋白的生物活性,如蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)活性。

[0020] 逻辑上,通过使用抗原来刺激宿主免疫系统以产生自身抗体,期望在控制肿瘤进展中具有相似的抗体治疗影响。

[0021] 与未免疫小鼠相比,接种PRL-3或EGFP抗体的C57BL6小鼠显示分别表达PRL-3或EGFP蛋白的转移性肿瘤的形成的显著降低。此外,接种了mT抗原的Py-mT小鼠显著防止乳腺中的肿瘤形成。获自194只野生型小鼠的结果证明可通过抗体疗法和接种成功阻断由细胞内癌蛋白引起的癌症转移。

[0022] 我们进一步提供了使用细胞内癌蛋白通过接种来预防癌症及其转移的方法,如权利要求中所述。

[0023] 作为本发明的第四个方面,提供了在患有或疑似患有癌症的个体中预防癌症如转移性癌症的方法,所述方法包括将预防有效量的细胞内癌蛋白,或其变体,同源物,衍生物或片段给予所述个体。

[0024] 细胞内癌蛋白可不包括胞外域或跨膜域。细胞内癌蛋白可包括细胞质或细胞核癌蛋白。细胞内癌蛋白可包括PRL-3蛋白或多瘤病毒中T(Py-mT)蛋白。

[0025] 癌症可与细胞内癌蛋白的过表达相关或由其引起。癌症可选自由以下组成的组:卵巢癌,乳腺癌,肝癌,胰腺癌,前列腺癌,胃癌,肺癌,阴茎癌,宫颈癌,脑癌,食道癌(食管癌),膀胱癌,肾细胞癌,卵巢淋巴瘤和皮肤黑色素瘤。

[0026] 癌症可包括转移性癌症。所述方法可使与未接受治疗的个体相比,接受治疗的个体中转移性肿瘤的数量降低至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%。

[0027] 根据本发明的第五个方面,我们提供用于癌症如转移性癌症的治疗方法中的能够与细胞内癌蛋白结合的抗体,所述方法包括将治疗有效量的能够与细胞内癌蛋白结合的抗体给予患有或疑似患有癌症的个体。

[0028] 根据本发明的第六个方面,提供了用于癌症如转移性癌症的预防方法中的细胞内

癌蛋白,或其变体,同源物,衍生物或片段,所述方法包括将预防有效量的细胞内癌蛋白,其变体,同源物,衍生物或片段给予患有或疑似患有癌症的个体。

[0029] 根据本发明的第七个方面,我们提供了一种药物组合物,其包括(a)细胞内癌蛋白,或其变体,同源物,衍生物或片段或(b)能够与细胞内癌蛋白结合的抗体,以及药用赋形剂,稀释剂或载体。

[0030] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用在本领域普通技术人员能力范围内的化学、分子生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术。这样的技术在文献中有说明。参见例如J.Sambrook,E.F.Fritsch,and T.Maniatis,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition,Books 1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Ausubel,F.M.等(1995和增刊;Current Protocols in Molecular Biology,ch.9,13,和16,John Wiley & Sons,New York,N.Y.);B.Roe,J.Crabtree,and A.Kahn,1996,DNA Isolation and Sequencing:Essential Techniques,John Wiley & Sons;J.M.Polak and James O'D.McGee,1990,In Situ Hybridization:Principles and Practice;Oxford University Press;M.J.Gait(主编),1984,Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach,Irl Press;D.M.J.Lilley和J.E.Dahlberg,1992,Methods of Enzymology:DNA Structure Part A:Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology,Academic Press;Edward Harlow,David Lane,Ed Harlow的Using Antibodies:A Laboratory Manual:Portable Protocol NO.I(1999,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN 0-87969-544-7);Ed Harlow(主编),David Lane(主编)的Antibodies:A Laboratory Manual(1988,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN 0-87969-314-2),1855.Ramakrishna Seethala,Prabhavathi B.Fernandes编写的Handbook of Drug Screening(2001,New York,NY,Marcel Dekker,ISBN 0-8247-0562-9);和Lab Ref:A Handbook of Recipes,Reagents,and Other Reference Tools for Use at the Bench,Jane Roskams和Linda Rodgers,2002,Cold Spring Harbor Laboratory,ISBN 0-87969-630-3.此处将所有这些通用文本以引用方式并入。

附图说明

[0031] 图1为示出了PRL-3 mAb有效抑制表达PRL-3的癌症细胞形成的转移性肿瘤的示意图。A,由B16F0和B16F10黑色素瘤细胞制备总细胞裂解液,并使用免疫印迹测定内源性PRL-3蛋白的表达。GAPDH用作内参对照。B,(在第1天)对C57BL6小鼠注射 1×10^6 个B16F0细胞,接着通过治疗方案使用PRL-3小鼠抗体(mAb,克隆#318)进行治疗。C.在第17-20天,未治疗的小鼠(n=5)的肺、肝、肾上腺、肾和骨中频繁出现肿瘤,而在接受治疗的小鼠的多数组织中,PRL-3 mAb消除了肿瘤形成。D,在试验的整个持续过程中,PRL-3 mAb“治疗的”B16F0受体小鼠的体重不断增加。E.使用不表达PRL-3的B16F10黑色素瘤细胞系进行平行试验时,使用PRL-3 mAb疗法未获得治疗结果。F.在试验的持续过程中,治疗和未治疗的B16F10受体小鼠的体重均持续降低。

[0032] 图2为示出了B细胞在介导抗体治疗事件中的重要性的示意图。A.使用Kaplan-Meier生存曲线来比较注射了B16F0细胞的缺乏B细胞的muMT小鼠的“治疗”和“未治疗”组。未治疗组(18.5天)和治疗组(19天)的中位存活率无明显差异。B.注射了B16F0的野生型C57BL6小

鼠的Kaplan-Meier分析显示未治疗组(17天)和治疗组(21.5天)之间的中位存活率具有统计学显著差异($P=0.0002$)。C.注射了B16F10的野生型C57BL6小鼠的Kaplan-Meier分析在未治疗组(16.5天)和治疗组(17.5天)之间无统计学显著差异。D.总结了治疗 and 未治疗小鼠的结果。将无效(或携带肿瘤)小鼠的数量置于分子,并将小鼠总数置于分母。Y轴所示的分数代表每组中携带肿瘤的小鼠与小鼠总数(n)的百分比。柱状图代表X轴所示的小鼠类型。

[0033] 图3为示出mT Ab有效抑制表达mT癌蛋白的乳腺肿瘤的形成的示图。A,基因分型用于识别转基因MMTV-PyMT雌性。#2,#6,#7和#10小鼠为杂合转基因雌性(+/-)。B,#2和#6转基因小鼠未经治疗而作为对照以监测乳腺肿瘤的进展。#7和#10转基因小鼠接受mT抗体i.v.注射。在试验末(3个月),处死所有小鼠。测量乳腺组织(肿瘤)的尺寸和重量。分别在底部画面指示5对乳腺并显示为4组。比例尺:1.5cm。C,在来自未治疗(a),治疗(b)和野生型(c)的乳房中,对整个封固的乳腺组织的形态学进行检查。E,Kaplan-Meier生存曲线用于比较MMTV-PyMT杂合转基因雌性的“治疗”和“未治疗”组。F.Y轴所示的分数代表每组中携带肿瘤的小鼠与小鼠总数(n)的百分比。柱状图代表X轴所示的小鼠类型。

[0034] 图4为一示图,其显示使用mT抗原对MMTV-PyMT小鼠进行免疫可防止表达mT细胞内蛋白的乳腺肿瘤形成。A.使用mT抗原进行免疫的治疗方案。B-D.MMTV-PyMT杂合转基因小鼠(TG)用于该实验。使用GST蛋白对TG雌性(#43,#44,#45)进行免疫。通过ELISA分析,这些小鼠血清中无mT抗体并显示乳腺肿瘤急剧进展。相反,使用GST-mT融合蛋白对TG雌性(#37,#40,#41)进行免疫;这些小鼠血清中具有高水平的mT抗体并显示显著的乳腺肿瘤抑制。10个乳腺在每个画面底部显示为4组。顶部两组乳腺由顶部的三对乳腺组成,而底部两组代表底部的两对乳腺。对10个乳腺的总重量进行测量。野生型小鼠(n=3)用作对照。比例尺:1.5cm。E,对“免疫”和“未免疫”的MMTV-PyMT小鼠的Kaplan-Meier生存曲线进行比较,其中mT免疫组(19.5周)的中位存活率($p=0.0004$)明显比未免疫组(14.5周)长。F.免疫和未免疫小鼠之间的结果总结。N代表每组中小鼠的数量;每个柱状图中的分数代表携带肿瘤的MMTV-PyMT小鼠相对于所使用的总TG雌性的比例。

[0035] 图5为一示图,其显示PRL-3-,EGFP-或mT-Ab有效抑制表达PRL-3,EGFP和mT-Ab的肿瘤形成。A,由EGFP-F0和EGFP-F10癌细胞制备总细胞裂解液。在两个细胞系中均检测到外源性EGFP蛋白。PRL-3仅在EGFP-F0中表达(但在EGFP-F10中较低)。GAPDH用作内参对照。B,汇集细胞的EGFP-F0和EGFP-F10稳定群体显示外源性表达EGFP。C.治疗方案显示(在第1天)经尾静脉对C57BL6小鼠注射 10^6 个癌细胞。接受治疗的小鼠i.v.注射EGFP mAb。未接受治疗的小鼠i.v.注射PBS。D-E,在第17-20天收获器官,检查并成像。在未治疗组的肺、骨、肾上腺和卵巢发现肿瘤,但在接受治疗的小鼠中显著降低。注意到EGFP-Ab特异性抑制EGFP肿瘤,但未抑制肺中的非EGFP肿瘤(画面e)。F.a.未治疗的FVB/N-MMTV-PyMT,b.mT mAb有效抑制转基因MMTV-PyMT小鼠中乳腺肿瘤的形成,c.非转基因小鼠显示与对照尺寸相同的乳腺组织。G.未治疗和使用针对细胞内靶点的抗体治疗的小鼠之间的结果总结。将无效(或携带肿瘤的)小鼠的数量置于分子,并将小鼠总数置于分母。使用三种不同抗体疗法针对其各自的细胞内靶点对146只小鼠进行测试。N代表每组中小鼠的数量;每个柱状图中的分数代表携带严重肿瘤的小鼠的比例。

[0036] 图6为一示图,其显示PRL-3,EGFP或mT细胞内抗原免疫的小鼠能够预防表达PRL-3,EGFP和mT的肿瘤。A.使用各抗原接种的治疗方案。B,随后经尾静脉使用一百万个EGFP-F0

或EGFP-F10癌症细胞对未免疫的,PRL-3免疫的或GFP免疫的小鼠进行激发。注射癌细胞3周后检查所有器官,并使用荧光显微镜摄影以显示转移性肿瘤的形态学。黑色肿瘤代表不表达EGFP的黑色素瘤细胞,而绿色肿瘤代表表达EGFP的黑色素瘤细胞。C,MMTV-PyMT杂合转基因雌性的概述:a.未免疫的MMTV-PyMT小鼠。b.mT免疫的小鼠显示乳腺肿瘤减少。D,未免疫和使用细胞内抗原免疫的小鼠之间的结果总结。在接种试验中使用84只小鼠。N代表每组中小鼠的数量;每个柱状图中的分数代表携带严重肿瘤的小鼠的比例。

[0037] 图7为一示图,其显示PRL-3嵌合mAb的产生与PRL-3发生特异性反应。A.概述嵌合mAb构建的主要步骤的示意图。B.PRL-3嵌合mAb可借助简介免疫荧光来识别DLD-1人结肠癌细胞中过表达的EGFP-PRL-3:a,EGFP-PRL-3在固定的DLD-1细胞中的分布(绿色);b,PRL-3嵌合抗体和抗人德克萨斯红显示与PRL-3蛋白的结合;c,合并的图像。比例尺:20 μ m。C.通过蛋白质印迹杂交分析来自过表达EGFP-PRL-3的DLD-1细胞的细胞裂解液,和来自过表达myc-PRL-3,myc-PRL-1,和myc-PRL-2的CHO稳定细胞系的细胞裂解液。PRL-3嵌合抗体特异性识别EGFP-PRL-3(48kDa)和myc-PRL-3(20kDa),但不与myc-PRL-1和myc-PRL-2反应。

[0038] 图8为一示图,其显示PRL-3嵌合抗体有效抑制表达外源性PRL-3的B16F0细胞形成的转移性肿瘤的形成。A.由F0和F10黑色素瘤细胞制备总细胞裂解液并通过免疫印迹进行分析。在F0细胞中检测到大量外源性PRL-3蛋白,但在F10细胞中几乎检测不到。B.在第1天,经尾静脉向裸鼠(n=27)注射 1×10^6 个F0细胞,接着每周两次静脉给予PRL-3嵌合mAb(第3,6,9,12,15天)。C.在试验末(第17天),对小鼠拍照并对组织进行解剖。在未接受治疗的小鼠(左侧)的肾上腺、肝脏、骨和腹部发现转移性肿瘤,但在接受治疗的小鼠(右侧)中未发现。D.试验中向裸鼠(n=22)注射 1×10^6 个F10细胞。在试验末(第17天),在未接受治疗(顶端画面)和接受治疗的小鼠(底端画面)中均发现数个肺转移肿瘤。E.显示了“治疗”和“未治疗”的F10受体的Kaplan-Meier生存曲线。

[0039] 图9为一示图,其显示PRL-3嵌合mAb抑制表达外源性PRL-3的A2780细胞和HCT-116细胞形成的转移性肿瘤的形成。A.由HCT116-luc2,HCT-116,A2780,和NCI-H460癌细胞系制备总细胞裂解液。在HCT116-luc2,HCT-116,和A2780细胞中检测到外源性PRL-3蛋白,但在H460中未检测到。B:在第1天,向裸鼠(n=6)注射 1×10^6 个HCT116-luc2癌细胞并随后在第3天给予PRL-3嵌合mAb(n=3,治疗组)或PBS(n=3,未治疗组),接着在7周内给予PRL-3嵌合mAb两次。癌细胞和抗体均经尾静脉注射。IVIS®成像系统用于在第7周内跟踪和监测体内肿瘤发展。C.在第1天,向裸鼠注射 1×10^6 个癌细胞并如B所述进行治疗。当小鼠病情严重时终止配对实验(未治疗/治疗)。每个画面顶端显示了试验的持续时间。D.来自注射了三种人癌细胞系的裸鼠的小鼠PRL-3(R3-mAb)或嵌合PRL-3(R3-hAb)抗体疗法的治疗结果的总结。携带肿瘤的小鼠的百分比为每组的平均值(n=小鼠的数量)并表示在Y轴上。在该试验中共使用101只小鼠。

[0040] 图10为一示图,其显示B细胞在介导PRL-3嵌合抗体疗效中的重要性。A.“治疗”和“未治疗”的注射了HCT-116的裸鼠和scid小鼠的Kaplan-Meier生存曲线(a,b)。“治疗”和“未治疗”的注射了B16F0的裸鼠和scid小鼠的Kaplan-Meier生存曲线(c,d)。B.裸鼠和scid小鼠中治疗性试验的结果总结(a-d)。携带肿瘤的小鼠的百分比为每组的平均值(n=小鼠数量)并表示在Y轴上。在该试验中共使用了151只小鼠。

[0041] 图11为一示图,其显示A.在细胞表面未检测到PRL-3。a.观察到与未使用EGF受体

抗体孵化的A431细胞相比(红线),使用EGF受体抗体孵化的A431细胞(黑线)发生峰移位。b. 在使用PRL-3 mAb孵化的F0细胞(黑线)和未使用Ab孵化的F0细胞(红线)之间未观察到峰移位。c. 在使用PRL-3 mAb孵化的F10细胞(黑线)和未使用Ab孵化的F10细胞(红线)之间未观察到峰移位。B. 在IVIS实时成像的工作模式1小时前静脉注射标记的抗体:a. 接受治疗的小鼠。早期递送抗体将持续攻击癌细胞以防止其进一步发展,导致开放期的微转移,因此荧光标记的PRL-3抗体能够进入并与“治疗”小鼠的转移性肺部肿瘤结合。我们观察到在接受治疗的小鼠中有强烈荧光标记的肺癌。b, 未治疗的小鼠。不受控制的癌细胞迅速增殖。它们自由形成宏观转移并建立防御范围,其为某种肿瘤微环境,使得抗体和免疫系统不易接近,因此在“未治疗”小鼠中,荧光标记的PRL-3抗体不能标记转移性肺部肿瘤。因此我们不能在未治疗的小鼠中观察到荧光标记的转移性肺癌。在H&E染色部分中,黑色箭头显示未治疗的B16F0受体的转移性肺部肿瘤的清晰边界(栅栏)。比例尺:200 μ m。红色箭头表示血管。

[0042] 图12为一示出,其显示PRL-3蛋白在肺癌和AML中上调。A. 在肺鳞状细胞癌中PRL-3表达的代表性IHC染色。B. 肺腺癌。比例尺:100 μ m。C. 对通过免疫组织化学(IHC)所检测的PRL-3-阳性肺癌的百分比进行总结并根据癌症亚型进行分类。D. 通过IHC检查AML骨髓样本,69中的24个(35%)显示PRL-3表达。显示了三个选择的图像。

[0043] 图13为一示图,其显示在治疗中涉及固有免疫系统中的NK细胞。试验前24小时裸鼠注射(n=2)和未注射(n=2)GM1抗体。在第1天,所有小鼠均经尾静脉注射 1×10^6 个F0细胞,接着每周两次对注射了GM1的小鼠静脉给予PRL-3嵌合mAb(第3,6,9,12,15天)。在第18天检查疗效。与未注射GM1的小鼠相比,无论使用PRL-3 mAb治疗与否,注射了GM1的裸鼠的肺、肝脏、肾上腺、睾丸和骨中均显示携带更加严重的肿瘤的负担(黑色)。

[0044] 图14为一示图,其显示治疗结果与靶点的组织表达模式高度相关。A, B. 在正常小鼠组织中PRL-3和PRL-2通过蛋白免疫印迹杂交的蛋白表达模式, GAPDH用作内参对照。C. HCT-116(PRL-2阳性细胞系)受体未能应答PRL-2抗体(该抗体也与PRL-1交叉反应)疗法,最可能由于PRL-2在我们所检查的多数小鼠组织中广泛表达。

[0045] 图15显示使用VHZ对C57BL6小鼠进行免疫并监测肿瘤发展。通过腹腔注射总体积为200ml的弗氏佐剂:20mg的VHZ抗原的100ml盐水溶液与100ml完全佐剂混合(Cat#77140, Pierce)对8周龄C57BL6小鼠进行免疫。接下来的两次免疫为注射总体积为200ml的佐剂:20mg VHZ抗原的100ml盐水溶液与100ml不完全佐剂混合(Cat#77145, Pierce)。每2周给予第二和第三次注射,并将100-200ml的尾部流血收集在肝素涂覆的毛细管中。由血样制备血浆并通过ELISA测量抗体效价。ELISA的详细步骤如前所述。选择血清中具有高效价VHZ抗体的小鼠并由侧面尾静脉注射 1×10^6 个表达VHZ的癌细胞。未接种的小鼠在该研究中用作阴性对照。

具体实施方式

[0046] 为了探索抗体靶向细胞内蛋白的可能性,在该研究中,我们选择把重点放在动物模型中用于抗癌治疗的三种代表性细胞内靶点上。

[0047] 首先,我们选择癌症相关的PRL-3细胞内磷酸酶作为PRL-3抗体疗法的靶点。PRL-3是1994和1998年确定的PRL(肝再生磷酸酶)家族三个成员(PRL-1, -2, 和-3)之一^{5,6}。这三个PRL构成蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)家族的亚组⁷。

[0048] 在2001年首次将PRL-3与结肠直肠癌转移相联系⁸。随后,报导了当与其正常相对物相比时,个体PRL-PTP的上调与多种类型的晚期人类转移性癌症相关⁹。

[0049] PRL磷酸酶代表可在人类癌症中用作生物标志物和治疗靶点的一组有趣蛋白¹⁰。PRL为细胞内C端异戊烯化的磷酸酶,而缺乏异戊烯化信号的PRL的变异型通常位于细胞核中^{11, 12}。

[0050] 通过EM免疫金标记可显示PRL-1和PRL-3在质膜内叶和早期核内体中的定位¹³。通过外源性试剂靶向PRL以除去PRL癌细胞需要其渗透至细胞内,是一项具有挑战性的任务。

[0051] 其次,我们选择胞浆增强型绿色荧光蛋白(EGFP),其为最初分离自水母Aequorea Victoria的普遍报导的蛋白,当暴露于蓝光下可发出绿色荧光。EGFP为有时可进入细胞核的细胞内蛋白。作为中性的外源蛋白,EGFP充当EGFP-B16F0和EGFP-B16F10黑色素瘤细胞中的人工“癌细胞特异性细胞内蛋白”。

[0052] 随后可通过EGFP mAb来靶向这些过表达EGFP的黑色素瘤细胞。由于EGFP不在宿主组织中表达,因此我们预期EGFP抗体在动物模型中具有较小的不良副作用。

[0053] 最后但同样重要的,我们选择了众所周知的癌蛋白作为第三个靶点,即多瘤病毒中T(mT)细胞内激酶¹⁴。我们使用Py-mT转基因杂合雌性(+/-)的乳腺癌模型,其在小鼠乳腺肿瘤病毒启动子/增强子的转录控制下携带mT致癌基因。数十年来,癌症研究委员会一直将转基因小鼠广泛用作极好的小鼠肿瘤模型,以评估转移性乳腺肿瘤表型的相对贡献^{15, 16}。

[0054] 为了更好的理解并将我们之前前景较好的临床前数据¹⁷扩展至未来在人类中临床应用,此处我们在野生型动物模型中进行了整体抗体疗法研究,以揭示抗体疗法可用于靶向细胞内癌蛋白这一迄今为止未认可的概念。

[0055] 实施例证明可使用针对同源抗原的抗体靶向上述细胞内蛋白。因此,我们提供通过针对细胞内癌蛋白的抗体来治疗与该细胞内癌蛋白相关的癌症。

[0056] 如果抗体能够识别其细胞内抗原,则细胞内抗原能够潜在用于接种从而刺激宿主免疫系统并产生抵抗其的抗体。这促使我们探索使用细胞内癌蛋白接种来抵抗表达特异性细胞内抗原的肿瘤。

[0057] 接种在刺激宿主免疫方面既便宜又有效。与细胞外抗原相比,接种所使用的细胞内蛋白由于其细胞内的位置而受到较少的关注。该接种的主要目的是人工激活抵抗特定细胞内蛋白的免疫系统以使某些个体事先具有抵抗表达该细胞内蛋白的特定肿瘤细胞的抗体,从而在将来预防肿瘤形成。

[0058] 接着,我们使用相同的三种细胞内抗原(PRL-3, EGFP, 和mT)在C57BL6野生型小鼠中进行接种。如实施例所示,我们获得了感兴趣的结果,所述结果为免疫了细胞内肿瘤抗原的小鼠能够消除表达该特异性肿瘤抗原的这些癌细胞以减少肿瘤形成。更重要的是,数据表明接种可预防个体疾病进展,所述个体在形成由已知细胞内癌蛋白引起的特定癌症方面具有遗传学上的高风险。如果这样的癌症特异性主动免疫疗法成功并有效,将比被动免疫具有明显优势。

[0059] 因此,我们提供了使用细胞内癌蛋白,通过接种来预防与该细胞内癌蛋白相关的癌症。

[0060] 在该研究中,我们在抗癌的抗体疗法和使用细胞内蛋白接种中均使用194只小鼠(图6)。由于肿瘤学家开始采用针对个体患者的调整治疗策略,癌症研究迅速走向个体化癌

症治疗。由于我们都有产生抗体以自我恢复的能力,因此抗体疗法和接种可实现个性化治疗的希望,是个体化给药的未来。

[0061] 目前,疫苗主要用于防止细菌和病毒感染以及靶向癌症细胞的一些细胞外蛋白(受体)。我们的数据表明靶向细胞内癌蛋白的策略对未来的癌症预防具有极大希望。

[0062] 使用抗细胞内癌蛋白的抗体治疗癌症

[0063] 如实施例所示,我们证明了抗PRL-3,EGFP和多瘤病毒中T(Py-mT)以及其它细胞内抗原的抗体可惊人地结合于它们的细胞内靶点。

[0064] 根据该文档的预期,由于位于细胞内,因此之前从未认为使用抗体靶向细胞内蛋白和这样的其它细胞内癌蛋白以消除癌细胞和癌症转移是可能的。我们说明了情况并非如此。

[0065] 因此我们主要提供了针对具有细胞内性质的致癌癌蛋白的抗体作为癌症疗法,特别是癌症转移疗法。我们提供了针对致癌癌蛋白的抗体在治疗癌症如癌症转移的方法中的应用,所述癌蛋白具有细胞内性质。

[0066] 我们提供了通过给予需要其的患者治疗有效量的抗细胞内癌蛋白的抗体,来治疗与致癌癌蛋白相关的癌症和癌症转移的方法,所述癌蛋白具有细胞内性质。

[0067] 能够结合于细胞内致癌多肽或癌蛋白,或其变体,同源物,衍生物或片段的抗体可用于治疗癌症。该抗体能够穿过细胞的质膜。

[0068] 抗体能够结合于并抑制癌蛋白的生物活性。例如,在癌蛋白包括PRL-1或PRL-3的情况下,可被抑制的生物活性可以包括蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)活性。

[0069] 抗体能够防止癌症的转移,优选结肠直肠癌,卵巢癌,乳腺癌,肝癌,胰腺癌,前列腺癌,胃癌,肺癌,阴茎癌,宫颈癌,脑癌,食道癌,膀胱癌,肾细胞癌,卵巢淋巴瘤和皮肤黑色素瘤。

[0070] 抗体可以包括单克隆抗体,或人源化单克隆抗体。

[0071] 抗体可以包括在与另一种实体或物质的组合中,如抗癌药物。

[0072] 能够结合于细胞内癌蛋白的抗体可以包括在药物组合物中,其包括这样的抗体或其与药用赋形剂,稀释剂或载体的组合。

[0073] 抗体或药物组合物可用于治疗或预防癌症或其转移的方法中。

[0074] 方法可以包括将癌细胞暴露于抗体。方法可以包括将治疗有效量的抗体,组合或组合物给予患有或疑似患有癌症的个体。癌症可以包括转移性癌症。

[0075] 癌症可以包括结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、肺癌、阴茎癌、宫颈癌、脑癌、食道癌、膀胱癌、肾细胞癌、卵巢淋巴瘤和皮肤黑色素瘤。

[0076] 与未治疗的个体相比,治疗的个体中转移性肿瘤的数量可降低至少50%。可降低至少60%。可降低至少70%。可降低至少80%。与未治疗的个体相比,治疗个体中的转移性肿瘤的数量可降低至少90%。

[0077] 我们进一步描述了在患有或疑似患有癌症的个体中治疗或预防癌症如转移性癌症的方法,所述方法包括给予个体治疗有效量的所述抗体,所述组合或所述组合物。

[0078] 方法可以包括如在任意上述段落中所述的特征。

[0079] 我们进一步提供了在患有或疑似患有癌症的个体中治疗或预防癌症如转移性癌症的方法,所述方法包括通过所述方法诊断个体中的癌症并治疗个体。

- [0080] 我们描述了包括提供所述的抗体并使该抗体结合于致癌多肽的步骤的方法。
- [0081] 抗体可结合于表达该致癌多肽的细胞。致癌多肽可以包括细胞内致癌多肽。
- [0082] 通过使用细胞内癌蛋白接种来预防癌症
- [0083] 根据文献的预期,由于位于细胞内,因此之前从未认为使用抗体靶向细胞内蛋白和其它细胞内癌蛋白来消除癌细胞和癌症转移是可能的。
- [0084] 因此,之前从未认为使用细胞内癌蛋白接种来预防癌细胞形成,癌细胞生长和癌症转移是可能的。我们说明了情况并非如此。
- [0085] 因此,我们主要提供了致癌癌蛋白作为癌症疫苗,特别是针对癌症转移的疫苗,所述癌蛋白具有细胞内性质。
- [0086] 我们提供了在预防与致癌癌蛋白相关的癌症包括癌症转移的方法中癌蛋白的应用,所述癌蛋白具有细胞内性质。
- [0087] 我们提供了通过给予需要其的患者预防有效量的细胞内癌蛋白来预防与致癌癌蛋白相关的癌症包括癌症转移的方法,所述癌蛋白具有细胞内性质。
- [0088] 我们提供了一种药物组合物,其包括抗细胞内癌蛋白的抗体,以及药用赋形剂,稀释剂或载体。我们提供了这样的药物组合物在治疗癌症包括癌症转移中的应用。
- [0089] 我们提供了一种药物组合物,其包括细胞内癌蛋白,以及药用赋形剂、稀释剂或载体。我们提供了这样的药物组合物在预防癌症包括癌症转移中的应用。
- [0090] 细胞内癌蛋白
- [0091] 细胞内癌蛋白和细胞内抗原可以包括任意一种或多种以下蛋白,或其变体,衍生物,同源物或片段。
- [0092] PRL-3
- [0093] 以下文本改编自OMIM第606449条。
- [0094] PRL-3也称为蛋白酪氨酸磷酸酶,4A型,3;PTP4A3。PRL-3的染色体定位在基因图谱位点8q24.3。
- [0095] 在心脏中,蛋白激酶调节收缩力,离子转运,代谢和基因表达。磷酸酶除了在去磷酸化中的作用,还涉及心脏肥大和功能障碍。
- [0096] 通过数据库检索和心脏cDNA库的筛选,Matter等人,2001,Biochem.Biophys.Res.Commun.283:1061-1068确定了编码PTP4A3的cDNA,他们称之为PRL3。所推断的PRL3蛋白与PRL1(PTP4A1;601585)是76%相同的,并且与小鼠Pr13是96%相同的。Northern印迹分析显示约2.3-kbPRL3转录本的表达主要在心脏和骨骼肌中,其中在胰腺中表达较低。该表达模式不同于PRL1和PRL2(PTP4A2;601584)的广泛表达。在原位杂交分析中,将PRL3的表达定位于心肌细胞。Tris甘氨酸凝胶分析显示PRL3表达为22-kD蛋白。功能和突变分析表明磷酸裂解依赖于PRL3的cys 104。PRL3的过表达导致细胞生长增加。蛋白质印迹分析显示p130cas(BCAR1;602941)应答血管紧张素II(106150)时的去磷酸化,表明PRL3在调节血管紧张素II诱导的细胞内钙瞬变中的作用。
- [0097] 为了深入了解转移的分子基础,Saha等人,2001,Science 294:1343-1346比较了结肠直肠癌和原发癌、良性结肠直肠肿瘤,和正常结肠直肠上皮的全局基因表达谱。在所研究的18种癌症转移中,PRL3均以高水平表达,但在非转移性肿瘤和正常结肠直肠上皮中表达水平较低。在所检查的12种转移中的3种中,发现PRL3基因的多拷贝在位于染色体8q24.3

的小扩增子中。Saha等人(2001)推断PRL3基因对结肠直肠癌的转移起重要作用。

[0098] 使用Stanford G3放射杂交板和数据库序列分析,Saha等人(2001)将PRL3基因定位于周围标志物145.20。PRL3基因也与位于距离8q端粒约3Mb处的8q24.3标志物SHGC-22154紧密相连。

[0099] [改编自MIM的文本结尾]

[0100] 小鼠和人类PRL-3蛋白详细描述在Li等(2005),Clin Cancer Res;11:2195-204中。

[0101] PRL-3序列

[0102] 本文所述的方法和组合物利用PRL-3多肽,其详细描述如下。如本文所使用的,术语“PRL-3”是指下表D2中描述的序列。

[0103]

Unigene	描述
AF041434.1	人类可能的异戊烯化蛋白酪氨酸磷酸酶 hPRL-3 mRNA, 完整的 cds
BT007303.1	人类蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3 mRNA, 完整的 cds
AK128380.1	人类 cDNA FLJ46523 fis, 克隆 THYMU3034099
NM_007079.2	人类蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3 (PTP4A3), 转录变体 2, mRNA
AY819648.1	人类 HCV p7-反式调节蛋白 2 mRNA, 完整的 cds
BC003105.1	人类蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3, mRNA (cDNA 克隆 MGC:1950 IMAGE:3357244) 完整的 cds
NM_032611.1	人类蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3 (PTP4A3), 转录变体 1, mRNA
AK311257.1	人类 cDNA, FLJ 18299
U87168.1	人类蛋白酪氨酸磷酸酶同源 hPRL-R mRNA, 部分 cds
AJ276554.1	用于蛋白酪氨酸磷酸酶 hPRL-3 的人类 mRNA, 短型
BC066043.1	小鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, mRNA (cDNA 克隆 MGC:90066 IMAGE:6415021), 完整 cds
AK190358.1	小鼠 cDNA, 克隆:Y1G0102103, 根据 BLAT 研究, 链: 正, 参照: ENSEMBL: 小鼠 - 转录本 - ENST:ENSMUST00000053232

[0104]

- CT010215.1 小鼠基因 Ptp4a3, 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3 的完整开放阅读框架 cDNA 克隆 RZPDo836H0950D, 完整 cds, 包括终止密码子
- AK147489.1 成年雄性小鼠脑中未定义的细胞系 cDNA, RIKEN 全长富集库, 克隆: M5C1053F14 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全长插入序列
- AK172192.1 小鼠活化脾脏 cDNA, RIKEN 全长富集库, 克隆: F830102P03 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全长插入序列
- AK143702.1 第 6 天的新生小鼠脾脏 cDNA, RIKEN 全长富集库, 克隆: F430011C20 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全长插入序列
- AF035645.1 小鼠可能异戊烯化的蛋白酪氨酸磷酸酶 mPRL-3 (Prl3) mRNA, 完整的 cds
- NM_008975.2 小鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3 (Ptp4a3), mRNA
- AK014601.1 第 0 天的新生小鼠脾脏 cDNA, RIKEN 全长富集库, 克隆: 4632430E19 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全长插入序列
- AK004562.1 成年雄性小鼠肺脏 cDNA, RIKEN 全长富集库, 克隆: 1200003F10 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全长插入序列
- AK003954.1 小鼠 18 天胚胎整体 cDNA, RIKEN 全长富集库, 克隆: 1110029E17 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全长插入序列
- BC027445.1 小鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, mRNA (cDNA 克隆 MGC:36146 IMAGE:4482106), 完整的 cds

[0105] “PRL-3多肽”可包括人类PRL-3多肽或由人类PRL-3多肽组成,如Unigene登录号为AF041434.1的序列。

[0106] 也包括任何、某些或所有这些多肽的同源变体和其衍生物。例如PRL-3可包括Unigene登录号BC066043.1。

[0107] VHZ

[0108] 本文所述的方法和组合物利用了VHZ,详细描述如下。

[0109] VHZ也称为DUSP23,MOSP,LDP-3,DUSP25,FLJ20442和RP11-190A12.1。

[0110] 如本文所使用的,术语“VHZ”是指GenBank登录号为NP_060293.2,NP_081001.1,XP_341157.1,XP_001170819.1,XP_001170835.1,XP_545747.2,NP_001076078.1,NP_001011371.1,NP_783859.1,NP_001034709.1,XP_001480730.1,XP_001117253.1或XP_001117256.1的多肽序列。

[0111] “VHZ多肽”可包括人类VHZ多肽或由人类VHZ多肽组成,如登录号为NP_060293的序

列。

[0112] 对于核酸序列,术语“VHZ多核苷酸”,“VHZ核苷酸”和“VHZ核酸”可交替使用,并且应理解其具体包括cDNA和基因组VHZ序列。这些术语也可包括能够编码VHZ多肽和/或其片段,衍生物,同源物或变体的核酸序列。

[0113] 当提及VHZ核酸时,是指VHZ核酸家族的任何成员。备受关注的是选自由NM_017823.3, NM_026725.2, XM_341156.3, XM_001170819.1, XM_00170835.1, XM_545747.2, NM_001082609.1, NM_001011371.1, NM_175732.1, NM_001039620.1, XM_001480680.1, XM_001117253.1或XM_001117256.1组成的组中的VHZ核酸。

[0114] 还包括如下面“其它VHZ核酸序列”所描述的任何一个或多个核酸序列。

[0115] 例如,VHZ核酸可包括GenBank登录号为NM_017823.3的人类VHZ序列。

[0116] 抗细胞内癌蛋白抗体

[0117] 我们描述了抗细胞内致癌蛋白抗体即抗细胞内癌蛋白抗体的生成和产生。这样的抗细胞内癌蛋白抗体能够结合癌蛋白,优选细胞内癌蛋白。

[0118] 在该文档中提供了单克隆抗体和人源化单克隆抗体及其特性。也公开了这些抗体中的每一个的人源化变体。

[0119] 为了避免疑问,除非上下文另有规定,否则当该文档中提及具体抗体名称时,其应当视为包括对小鼠单克隆抗体(如由杂交瘤细胞分泌的)以及其人源化变体的提及。因此,例如当提及抗体NNN时,包括单克隆抗体NNN(即,小鼠杂交瘤分泌的称为NNN的抗体)以及人源化单克隆抗体NNN。

[0120] 根据本文所公开的信息并采用分子生物学技术,本领域技术人员可制备该文档中所描述的抗体,我们也对所述分子生物学技术进行了详细描述。

[0121] 为此目的,可采用抗细胞内癌蛋白的单克隆抗体的可变区的序列。可生成这些可变区的变体,同源物,片段和衍生物。技术人员利用这样的序列信息可制备包括这些可变区或其变体,同源物,片段和衍生物的抗体。也可使用核酸序列构建体来表达抗细胞内癌蛋白的单克隆抗体。最后,也可采用能够表达抗细胞内癌蛋白的人源化单克隆抗体的序列构建体。我们描述了通过转染了构建体以及这些人源化构建体的变体、同源物、片段和衍生物的细胞来表达感兴趣的抗体的方法。

[0122] 利用这样的序列和表达方法,技术人员可容易地转染相关宿主细胞并使其表达完整单克隆或人源化抗细胞内癌蛋白抗体、或其变体、同源物、片段和衍生物。

[0123] 我们进一步提供了主要具有细胞内癌蛋白结合活性的多肽。这样的多肽包括抗细胞内癌蛋白抗体。细胞内癌蛋白结合多肽可包括与上述抗细胞内癌蛋白的单克隆抗体相同或相似的一种或多种性质。为简单起见,通常将多肽称为“抗细胞内癌蛋白抗体”。

[0124] 构建不为(或不描述为)抗体或免疫球蛋白但包括如本文所述的抗细胞内癌蛋白结合活性的结合分子在读者的技术范围内。因此,在上下文允许的情况下,术语“抗细胞内癌蛋白抗体”应视为包括能够结合细胞内癌蛋白的任何分子。这样的分子可包括多肽,小分子,以及抗体和免疫球蛋白,并可通过本领域已知的各种手段确定,例如通过筛选合适的细胞内癌蛋白结合活性库。

[0125] 抗细胞内癌蛋白抗体(包括细胞内癌蛋白结合分子)可包括与上述抗细胞内癌蛋白的单克隆抗体相似或相同的性质。这样的相似或相同性质特别可包括结合性质。抗细胞

内癌蛋白抗体通常能够结合于细胞内癌蛋白多肽。

[0126] 因此,术语“抗细胞内癌蛋白抗体”可包括单克隆抗体(及其人源化对应物)。也包括多肽,其包括抗细胞内癌蛋白或其变体、同源物、片段和衍生物的抗体的可变区。当上下文允许时,该术语也应包括对如下所述的抗细胞内癌蛋白抗体的变体,同源物,片段和衍生物的提及。

[0127] 细胞内癌蛋白表位

[0128] 抗细胞内癌蛋白抗体可特异地结合于细胞内癌蛋白上的表位。

[0129] 本领域已知确定特定抗体所结合的表位的方法。例如Hanson等,(2006).Respiratory Research,7:126描述了该表位定位方法。此外,技术人员能够生成抗体并针对特定性质对其进行筛选。

[0130] 抗PRL抗体可包括抗细胞内癌蛋白的单克隆抗体的可变区。在单一抗体分子中它们可包括相同或不同的可变区。可包括一个可变区或多于一个的可变区。因此,我们向技术人员提供制备任意数量抗体的能力,所述抗体包括与抗细胞内癌蛋白的单克隆抗体相同或相似的结合反应性。

[0131] 这样的抗体可包括全长或基本完整的抗体序列(即,重链和轻链),或其可包括完整抗体的片段(如Fv,F(ab')和F(ab')₂片段或单链抗体(scFv))。抗体可进一步包括包含抗体的抗原结合位点的融合蛋白或合成蛋白,详细描述如下。可将这样的抗体进行基因改造以使其具有所需性质是显而易见的,如宿主反应性降低,排斥降低等。

[0132] 基因改造可包括“人源化”,该术语是指在抗体序列如小鼠抗体序列中包括(或替代)一个或多个人类残基或序列。在上下文中,“人源化”包括“嵌合”抗体,其中抗体包括不连续的小鼠和人类序列片段,例如,其中一个或两个可变区包括小鼠序列,并且其余抗体分子(如恒定区)包括人类序列。在这样的嵌合抗体中,例如小鼠或大鼠抗体的完整可变区可与人类恒定区共同表达。这提供了具有人类效应子功能的嵌合抗体,并降低了鼠Fc区域导致的免疫原性(HAMA)。

[0133] 通常,“嵌合抗体”可以指具有由来自鼠免疫球蛋白基因的核苷酸序列编码的重链和轻链和由来自人免疫球蛋白基因的核苷酸序列编码的重链和轻链的抗体。

[0134] “人源化”也包括CDR移植或重构抗体。因此其包括在更加离散的水平上的基因改造,例如小鼠可变区发生突变从而包括人类残基以降低免疫原性的抗体。在这样的抗体中,仅来自啮齿动物抗体V区的互补决定区可与来自人类V区的框架区结合。这样的抗体应比嵌合抗体更加人源化并具有较低的免疫原性。

[0135] 抗细胞内癌蛋白抗体通常能够在多种条件下结合于癌蛋白多肽。

[0136] 在一个实施方式中,结合环境包括细胞内条件。也就是说在完整或不可通透的细胞中,抗细胞内癌蛋白抗体能够结合于癌蛋白多肽。这样的不可通透的细胞可包括未暴露或基本未暴露于透化剂如洗涤剂(例如,TritonX-100)或洋地黄皂苷的细胞。

[0137] 当在细胞内,在细胞膜内,或包封于细胞内时,如本文所述的抗细胞内癌蛋白抗体能够结合于癌蛋白。

[0138] 类似地,如本文所描述,在包括细胞内部的环境中,抗细胞内癌蛋白抗体可结合于细胞内癌蛋白多肽。细胞内癌蛋白多肽可以与一种或多种细胞结构相连,例如细胞膜、细胞器、细胞骨架结构、核膜等的内叶。细胞内癌蛋白多肽可位于细胞核内。在这些情况中的每

一种下,抗细胞内癌蛋白抗体均能够在细胞内环境中与癌蛋白多肽结合。

[0139] 抗细胞内癌蛋白抗体能够在细胞内环境中以多种方式结合于细胞内癌蛋白多肽。抗细胞内癌蛋白抗体能够穿过质膜。其还能够通过例如细胞摄取而进入细胞内癌蛋白多肽的结合区域。其可内化或转位或借助任何手段递送到细胞中。

[0140] 在另一个实施方式中,结合条件包括细胞外条件。因此抗细胞内癌蛋白抗体在细胞外环境中能够结合于其同源的细胞内癌蛋白多肽。

[0141] 因此抗细胞内癌蛋白抗体能够在细胞外结合于癌蛋白多肽。换言之,当在细胞外部时,如本文所述的抗细胞内癌蛋白抗体能够结合于细胞内癌蛋白。类似地,如本文所述,在细胞内部之外的环境中,抗细胞内癌蛋白抗体可结合于细胞内癌蛋白多肽。抗细胞内癌蛋白抗体能够根据情况结合于分泌的细胞内癌蛋白多肽。癌蛋白多肽可包括循环癌蛋白多肽。

[0142] 抗细胞内癌蛋白抗体能够结合于外部或外化的癌蛋白多肽。其可在血液循环中结合于分泌的癌蛋白多肽。

[0143] 抗细胞内癌蛋白抗体与其靶点之间的结合可较多或较少,较强或较弱,可为短暂的,半永久或永久的。

[0144] 抗细胞内癌蛋白抗体与细胞内癌蛋白多肽的结合可发生在细胞内。这样的结合可使细胞内癌蛋白多肽失活,抑制或降低其活性。结合可抵消细胞内癌蛋白的活性。活性可包括任何由细胞内癌蛋白多肽导致或与其相关的生物活性。活性可包括与另一种蛋白结合,例如下游蛋白或因子。抗细胞内癌蛋白抗体与细胞内癌蛋白多肽的结合可使下游蛋白或因子失活,抑制或降低其活性。活性可包括与其它细胞联系,例如循环中的细胞如转移性癌细胞。因此,抗细胞内癌蛋白抗体在血液循环中可抵消细胞内癌蛋白多肽以防止细胞内癌蛋白与下游因子结合或防止其在循环中与其它细胞联系。

[0145] 活性可包括生化活性或致病活性。生化活性可包括催化活性。催化活性可包括磷酸酶活性。活性可包括生长调节活性,癌症活性,致癌活性或转移活性。

[0146] 抗细胞内癌蛋白的抗体可用于治疗人类或其它动物的疾病。这样的抗细胞内癌蛋白抗体可具有抗癌活性。抗细胞内癌蛋白抗体能够防止肿瘤的转移性扩散。

[0147] 因此,我们提供了抗细胞内癌蛋白抗体在治疗或预防疾病如癌症中的应用。癌症可包括转移性癌症。

[0148] 抗细胞内癌蛋白抗体可用作治疗癌症如已建立的肿瘤的转移的药物或疗法。其可用于预防癌症或其转移。

[0149] 可治疗或可预防的癌症可包括与细胞内癌蛋白的表达或过表达相关的癌症。细胞内癌蛋白蛋白可为家族的相关成员。

[0150] 癌症可包括任意数量的癌症,如结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、肺癌、阴茎癌、宫颈癌、脑癌、食道癌、膀胱癌、肾细胞癌、卵巢淋巴瘤和皮肤黑色素瘤。

[0151] 治疗通常包括将癌细胞或疑似为癌细胞的细胞与抗细胞内癌蛋白抗体接触。可将细胞暴露于抗细胞内癌蛋白抗体。可将其另外暴露于第二化合物,如抗癌药物,抗另一种蛋白的抗体,或抗另一种癌蛋白的抗体。当情况是这样时,可将细胞暴露于抗细胞内癌蛋白抗体和第二化合物,或依次单独暴露。暴露可重复多次。可使用任意量或相对量的抗细胞内癌

蛋白抗体和第二化合物的组合,可暴露任意时间。

[0152] 因此如上所述,我们提供抗细胞内癌蛋白抗体和其它化合物的组合在治疗疾病如癌症中的应用。

[0153] 细胞可为单个细胞,或可以为细胞团,如癌细胞或肿瘤细胞团。细胞可在生物体体内。生物体可为已知患有癌症或疑似患有癌症的个体。治疗可包括将一种抗体或多种抗体给予生物体。如上所述,可给予单一抗体,或可给予抗细胞内癌蛋白抗体和第二化合物的组合。如上所述,可同时或依次给予。因此,治疗可包括将抗细胞内癌蛋白抗体与第二化合物同时或依次给予个体。

[0154] 抗细胞内癌蛋白抗体通常可以包括能够结合于细胞内癌蛋白分子的任意免疫球蛋白,详细描述如下。

[0155] 细胞内癌蛋白多肽

[0156] 细胞内癌蛋白多肽可用于各种方法,例如,用于制备或筛选抗细胞内癌蛋白药物如特定细胞内癌蛋白结合药剂,特别是抗细胞内癌蛋白抗体。

[0157] 细胞内癌蛋白多肽也可用作疫苗以接种患有癌症或疑似患有癌症的个体。因此,可将细胞内癌蛋白多肽给予这样的个体以提高针对细胞内癌蛋白的免疫应答。

[0158] 以下将对其进行进一步详细描述。对细胞内癌蛋白多肽的表达进行检测以用于癌症的诊断或检测,特别是乳腺癌。

[0159] “多肽”是指包括通过肽键或修饰的肽键即肽等排体彼此连接的两个或多个氨基酸的任何肽或蛋白。“多肽”是指通常称为肽、寡肽或寡聚物的短链,以及通常称为蛋白的长链。多肽可包含除20种基因编码的氨基酸以外的氨基酸。

[0160] “多肽”包括通过天然过程如转录后过程修饰的氨基酸序列,或通过本领域熟知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。在文本中和更详细的专著中以及大量研究文献中描述了这样的修饰。修饰可发生在多肽的各处,包括肽骨架,氨基酸侧链和氨基或羧基末端。应理解,相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定多肽的数个位点。此外,给定多肽可包含多种类型的修饰。

[0161] 多肽由于泛素化而可为支化的,并且也可为支化或非支化的环状。环状,支化和支化环状多肽可来自转录后的天然过程或由合成方法制备。修饰包括乙酰化,酰化,ADP-核糖基化,酰胺化,共价连接黄素,共价连接血红素部分,共价连接核苷酸或核苷酸衍生物,共价连接脂质或脂质衍生物,共价连接磷脂酰肌醇,交联,环化,形成二硫键,去甲基化,形成共价交联,形成胱氨酸,形成焦谷氨酸,甲酰化, γ -羧化,糖基化,形成GPI锚,羟基化,碘化,甲基化,十四烷酰化,氧化,蛋白水解处理,磷酸化,异戊烯化,消旋化,硒化,硫酸化,转运RNA介导的氨基酸添加至蛋白如精氨酰化,和泛素化。参见例如Proteins-Structure and Molecular Properties,2nd Ed.,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,New York,1993和Wold,F.,Posttranslational Protein Modifications:Perspectives and Prospects,pgs.1-12in Posttranslational Covalent Modification of Proteins,B.C.Johnson,Ed.,Academic Press,New York,1983;Seifter等,“Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”,Meth Enzymol(1990)182:626-646和Rattan等,“Protein Synthesis:Posttranslational Modifications and Aging”,Ann NY Acad Sci(1992)663:48-62。

[0162] 术语“多肽”包括本领域已知的各种合成肽变体,如逆反D肽。肽可为抗原决定簇和/或T细胞表位。肽在体内具有免疫原性。肽能够在体内诱导中和抗体。

[0163] 当应用于细胞内癌蛋白时,所产生的氨基酸序列可具有一种或多种活性,如与细胞内癌蛋白多肽例如人类细胞内癌蛋白相同的生物活性。例如,与正常乳腺细胞相比,细胞内癌蛋白同源物在癌细胞中的表达水平升高。特别地,术语“同源物”包括结构和/或功能等同,且所产生的氨基酸序列具有细胞内癌蛋白活性。关于序列同一性(即相似度),可以存在至少70%的序列同一性,如至少75%,如至少85%,如至少90%。可以存在至少95%,如至少98%的序列同一性。这些术语也包括来自氨基酸的多肽,其为细胞内癌蛋白核酸序列的等位基因变体。

[0164] 当提及多肽如细胞内癌蛋白的“活性”或“生物学活性”时,这些术语是指细胞内癌蛋白的代谢或生理功能,包括相似的活性或提高的活性或这些活性的不良副作用降低。还包括细胞内癌蛋白的抗原性和免疫原性活性。本领域已知该活性的实例以及分析和量化这些活性的方法,并且在本文别处详细描述。

[0165] 抗体

[0166] 如本文所使用,在上下文允许时,术语“抗体”和“免疫球蛋白”可交替使用。这些术语包括抗体分子的蛋白水解裂解或重组制备部分的片段,其能够选择性与细胞内癌蛋白或其表位反应或对其进行识别。

[0167] 这样的蛋白水解和/或重组片段的非限定性实例包括Fab,F(ab')₂,Fab',Fv片段,和含有由肽连接子连接的VL和VH域的单链抗体(scFv)。这些Fv可共价或非共价连接以形成具有两个或多个结合位点的抗体。

[0168] “ScFv分子”是指VH和VL伴侣结构域通过可弯曲(柔性)的寡肽连接的分子。涉及保留特异性结合位点的抗体片段合成的技术的综述参见Winter&Milstein(1991)Nature 349,293-299。

[0169] 完整抗体和F(ab')₂片段为“二价”。“二价”是指所述抗体和F(ab')₂片段具有两个抗原结合位点。相反,Fab,Fv,ScFv和dAb片段为单价的,其仅具有一个抗原结合位点。

[0170] 抗细胞内癌蛋白抗体可包括高亲和力的抗体,其解离率(off rate)为 10^{-2}s^{-1} 至 10^{-4}s^{-1} 。解离率可以为约 $2\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 。

[0171] 如本文所使用的,术语“解离率”是指抗体如本文公开的抗细胞内癌蛋白抗体的解离速率(k_{off})。可使用BIAevaluation软件(Pharmacia)进行测量。由于其反映Fab片段对抗原的亲和力,因此低解离率是期望的。

[0172] 根据抗体如抗细胞内癌蛋白抗体的解离速率或解离率(k_{off})对术语“亲和力”进行定义。解离率越低,抗体如抗细胞内癌蛋白抗体对抗原如细胞内癌蛋白的亲和力越高。

[0173] 抗细胞内癌蛋白抗体可包括肽自身或融合蛋白的一部分。

[0174] 本文所述的抗细胞内癌蛋白抗体包括包含细胞内癌蛋白结合活性的任意抗体,所述结合活性如对细胞内癌蛋白的结合能力。

[0175] 抗细胞内癌蛋白抗体也包括小鼠的,人源化的或人类的整个或完整抗体,这样的抗体衍生物和生物活性片段。这些可包括具有细胞内癌蛋白结合活性的抗体片段,其具有氨基酸替换或具有连接于氨基酸官能团的糖或其它分子等。

[0176] 抗细胞内癌蛋白抗体可包括分离的抗体或纯化的抗体。其可由任意合适的来源获

得或制备,可为天然或非天然的,或可为合成抗细胞内癌蛋白抗体,半合成性抗细胞内癌蛋白抗体,衍生化的抗细胞内癌蛋白抗体或重组抗细胞内癌蛋白抗体。

[0177] 在抗细胞内癌蛋白抗体为非天然抗细胞内癌蛋白抗体的情况下,其可包括至少由重组DNA技术制备的一部分或由化学合成技术所制备的抗细胞内癌蛋白抗体或其组合。

[0178] 如本文所使用的,术语“衍生物”包括抗细胞内癌蛋白抗体的化学修饰。这样的修饰的说明为例如使用烷基,酰基,或氨基代替氢。抗细胞内癌蛋白抗体的这些序列可与天然存在形式相同,或可为其变体、同源物、片段或衍生物。

[0179] 抗体可变区

[0180] 如本文所使用的,术语“可变区”是指轻链(VL)和重链(VH)的可变区或结构域,其根据具体情况含有针对结合识别特异性和针对抗细胞内癌蛋白(或变体,同源物,片段或衍生物)的抗体的整体亲和力的决定簇。

[0181] 每对轻链(VL)和重链(VH)的可变域参与抗原识别并形成抗原结合位点。轻链和重链域的结构域具有相同的一般结构,并且每个结构域具有序列相对保守的四个框架(FR)区,由三个互补决定区(CDR)连接。FR区维持可变域的结构完整性。CDR为可变域中的多肽片段,其介导抗原的结合。

[0182] 如本文所使用的,术语“恒定区”是指抗体(或变体,同源物,片段或衍生物)的轻链(CL)和重链(CH)结构域,其可提供结构稳定性和其它生物功能如抗体链连接,分泌,经胎盘的迁移率,和互补结合,但其不参与结合细胞内癌蛋白或表位。氨基酸序列和相应的恒定区基因的外显子序列将取决于其衍生的物种。然而,氨基酸序列的变化导致同种异型对物种中的特定恒定区域的相对限制。“同种异型”是与等位基因不同的抗原决定簇(或表位)。

[0183] 每条链的可变区通过连接多肽序列而连接于恒定区。由轻链基因中的“J”序列,和重链基因中的“D”序列和“J”序列的组合来编码连接序列。

[0184] 预防和治疗方法

[0185] 我们公开了治疗与过量细胞内癌蛋白表达或活性有关的异常疾病如癌症的方法。预防癌症(即预防)的方法也适当采用相同或相似的方法。

[0186] 总的来说,我们的方法涉及通过调节(如下调)细胞中细胞内癌蛋白的表达,数量或活性来操纵癌细胞。该方法可涉及破坏或消除癌细胞。癌细胞可包括表达细胞内癌蛋白的癌细胞。与非癌细胞相比,癌细胞可以为过表达细胞内癌蛋白的细胞。我们的方法可包括将患者暴露于抗细胞内癌蛋白抗体。抗细胞内癌蛋白抗体可包括人源化抗细胞内癌蛋白抗体。

[0187] 癌细胞可来自细胞内癌蛋白阳性的癌症患者。因此,我们的方法可包括从细胞内癌蛋白阳性的癌症患者体内消除细胞内癌蛋白过表达的癌细胞。

[0188] 因此,我们的方法包括使用抗细胞内癌蛋白人源化抗体从细胞内癌蛋白阳性的癌症患者体内消除细胞内癌蛋白过表达的细胞。

[0189] 在操纵步骤之前或之后可进行对细胞中的调节的细胞内癌蛋白表达,数量或活性进行检测的步骤。检测步骤可检测上调或下调的细胞内癌蛋白的表达,数量或活性。可使用任何调节或下调细胞内癌蛋白的方法,如在本文别处将进行详细描述。

[0190] 特别地,方法可包括将细胞暴露于能够特异性结合于细胞内癌蛋白的抗细胞内癌蛋白抗体。在个体患有或疑似患有癌症的情况下,方法可包括给予个体治疗有效量的抗细

胞内癌蛋白抗体。抗细胞内癌蛋白抗体及其给予方法在本文别处进行详细描述。

[0191] 此外,可替换地或另外地,该方法可包括使用细胞内癌蛋白接种,即,将预防有效量的细胞内癌蛋白给予患有或疑似患有癌症的个体。

[0192] 根据我们的方法,由于操纵的结果,癌细胞变得不具癌性或者侵袭性或转移性癌细胞变得不具侵袭性或转移性。癌症可特别包括癌症如侵袭性或转移性癌症,其选自结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、肺癌、阴茎癌、宫颈癌、脑癌、食道癌、膀胱癌、肾细胞癌、卵巢淋巴瘤和皮肤黑色素瘤组成的组。

[0193] 由于细胞内癌蛋白与癌症的侵略性和侵袭性相关,因此可在患有癌症的个体细胞中,在癌细胞或非癌细胞中检测细胞内癌蛋白的水平,并评估癌症的侵略性。细胞内癌蛋白量,表达或活性水平比正常细胞高表明侵略性或侵袭性癌症,因此需要并选择更强或更严格的治疗。类似地,较低的水平可以表明侵略性或侵袭性较低的治疗。

[0194] 本文所述的方法通常可用于任意细胞内癌蛋白相关疾病的治疗。细胞内癌蛋白相关疾病包括增生性疾病,特别是癌症。例如,细胞内癌蛋白相关疾病可包括转移性癌症,侵袭性癌症或侵略性癌症。

[0195] 本文所述的方法和组合物可适当使接受治疗的个体中的可测量标准与未接受治疗的个体相比提高。

[0196] 因此,可制定能够反映癌症或患者健康的许多标准。有用的标准可包括肿瘤大小、肿瘤维度、肿瘤的最大维度、肿瘤数量、肿瘤标志物(如甲胎蛋白)的存在、转移的程度或数量等。

[0197] 因此,例如,通过合适的分析或测试测量时,接受治疗的个体可显示肿瘤大小或数量降低。与未接受治疗的个体相比,接受治疗的个体可显示例如特定肿瘤的肿瘤大小降低1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,15%,20%,25%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%或更多,或肿瘤数量降低,或两者均降低。

[0198] 例如,如果与细胞内癌蛋白相关疾病相关的条件与对照相比明显受到抑制(即50%及以上)时,可定义为“治疗”该疾病。与对照相比,抑制可为至少75%,如与对照相比为90%,95%或100%。条件可包括细胞增殖,或其可包括细胞周期时间,细胞数量,细胞迁移,细胞侵袭性,肿瘤形成,肿瘤转移,肿瘤扩散等。术语“治疗”也包括预防或减轻癌症。

[0199] 本文所使用的术语增生性疾病广义上包括任何需要控制细胞周期的疾病。增生性疾病特别包括恶性和肿瘤前疾病。本文所述的方法和组合物尤其可用于腺癌的治疗或诊断,如小细胞肺癌,肾癌,子宫癌,前列腺癌,膀胱癌,卵巢癌,结肠癌和乳腺癌。例如,可治疗的恶性肿瘤包括急性和慢性白血病,淋巴瘤,骨髓瘤,肉瘤如纤维肉瘤,黏液肉瘤,脂肪肉瘤,淋巴管内皮肉瘤,血管肉瘤,内皮肉瘤,软骨肉瘤,骨源性肉瘤,脊索瘤,淋巴管肉瘤,滑膜瘤,间皮瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,卵巢癌,前列腺癌,胰腺癌,乳腺癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,绒毛膜癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,精原细胞癌,胚胎癌,宫颈癌,睾丸癌,肺癌,小细胞肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,星形细胞癌,室管膜瘤,松果体瘤,成血管细胞瘤,听神经瘤,成神经管细胞瘤,颅咽管瘤,少突神经胶质瘤,脑膜瘤,黑色素瘤,神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0200] 涉及使用抗细胞内癌蛋白抗体的抗体治疗方法可与该疾病的其它治疗方法结合,

包括针对如本文所述的细胞内癌蛋白多核苷酸的反义结构的表达,并将其给予肿瘤细胞以抑制基因功能并防止肿瘤细胞生长或发展。

[0201] 反义构建体可用于抑制基因功能以防止增殖细胞的生长或发展。反义构建体,即核酸如RNA,与正义核酸mRNA或互补的构建体详细描述在US 6,100,090(Monia等),和 Neckers等,1992,Crit Rev Oncog 3(1-2):175-231中,将文档的教导以引用方式专门并入本文中。

[0202] 在一个具体实例中,可通过完全或部分降低细胞内癌蛋白的数量、表达或活性来治疗或预防癌症,例如通过能够结合并破坏细胞内癌蛋白mRNA的siRNA。

[0203] RNA干扰(RNAi)是通过直接引入双链RNA(dsRNA)诱导转录后基因沉默(PTGS)的方法,并成为敲除各种生物体的特定基因表达的有用工具。Fire等,Nature 391:806-811 (1998)描述了RNAi。已知PTGS的其它方法,包括例如引入转基因或病毒。通常,在PTGS中,由于快速降解,因此沉默基因的转录本合成但未积累。在例如Ambion.com万维网站的目录“/hottopics/”的“rna”文件中描述了PTGS的方法,包括RNAi。

[0204] 本文描述了合适的RNAi的体外方法。一种这样的方法涉及siRNA(小干扰RNA)的引入。目前的模型表明21-23个核苷酸的dsRNA可诱导PTGS。用于设计有效的siRNA的方法描述在例如上述Ambion网站。RNA前体如短发夹RNA(shRNA)也可由全部或部分细胞内癌蛋白核酸序列编码。

[0205] 可替换地,双链(ds)RNA是干扰一系列生物体的基因表达的强有力的方式,其最近显示在哺乳动物中获得成功(Wianny and Zernicka-Goetz,2000,Nat Cell Biol 2:70-75)。与细胞内癌蛋白多核苷酸的序列相对应的双链RNA可引入或在候选生物体的卵母细胞或细胞中表达以干扰细胞内癌蛋白活性。

[0206] 本领域技术人员已知调节细胞内癌蛋白基因表达的其它方法,包括显性负方法。这也可与使用抗细胞内癌蛋白抗体的抗体疗法相结合。因此,本文中的另一种方法是使用细胞内癌蛋白多肽的非功能性变体,其与内源性基因产物相竞争,导致功能的抑制。

[0207] 也可通过引入可抑制基因表达或功能活性的肽或小分子来调节细胞内癌蛋白基因表达。可将这样的肽或小分子与抗细胞内癌蛋白抗体组合给予以治疗癌症如转移性癌症。

[0208] 因此,通过分析确定的能够结合于或调节如下调细胞内癌蛋白多肽的数量、活性或表达的化合物可给予肿瘤或增殖细胞,以防止细胞内癌蛋白多肽的作用。这样的化合物可与药用载体共同给予,其用量可有效下调细胞内癌蛋白的表达或活性,或活化或下调控细胞内癌蛋白表达、活性或数量的第二信号,从而减轻异常疾病。

[0209] 可替换地,可采用基因疗法来控制相关细胞如对象的癌细胞中的细胞内癌蛋白的内源性产生。例如,如以下所讨论,可对编码细胞内癌蛋白siRNA或其部分的多核苷酸进行基因改造,以在复制缺陷的逆转录病毒载体中表达。随后可分离逆转录表达构建体并引入到包装细胞中,使用含有编码抗细胞内癌蛋白siRNA的RNA的逆转录病毒质粒载体转导所述包装细胞以使包装细胞产生含有感兴趣序列的感染性病毒颗粒。可将这些生产细胞给予对象以在体内对细胞进行基因改造并在体内调节细胞内癌蛋白多肽的表达。基因疗法的综述见第20章, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches,(以及其中引用的参考文献)in Human Molecular Genetics,T Strachan and

A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd(1996)。

[0210] 在某些实施方式中,癌细胞中的细胞内癌蛋白的水平下降。此外,在这样的实施方式中,治疗可靶向或对这样的癌细胞具有特异性。细胞内癌蛋白的表达可以仅在病变细胞(即癌变的细胞)中特异性下降,并且在其它非病变细胞中未大幅下降。在这些方法中,细胞内癌蛋白的表达可以在其它细胞即不为癌细胞的细胞中未大幅下降。因此,在这样的实施方式中,非癌细胞中的细胞内癌蛋白的水平在治疗过程中或治疗后基本保持相同或相似。

[0211] 多肽序列

[0212] 应理解,本文所公开的多肽序列并不限于本文所描述的特定序列,而且根据情况还包括获自任意来源的同源序列,例如相关的细胞同源物,来自其它物种的同源物及其变体或衍生物,只要必须具有至少一种抗细胞内癌蛋白抗体的生物活性。

[0213] 因此该公开包括本文所述的氨基酸序列的变体、同源物或衍生物,以及本文所公开的核苷酸序列所编码的氨基酸序列的变体、同源物或衍生物。该序列通常称为“抗细胞内癌蛋白抗体”序列。

[0214] 生物活性

[0215] 在某些实施方式中,序列根据情况包括至少一种抗细胞内癌蛋白抗体的生物活性。

[0216] 生物活性可包括免疫活性。抗细胞内癌蛋白抗体可包括与细胞内癌蛋白抗体或其人源化变体相同或相似的免疫活性。“免疫活性”是指抗细胞内癌蛋白抗体结合于细胞内癌蛋白抗原后,在合适的动物或细胞中诱导特异性免疫应答的能力。

[0217] 生物活性可包括抗原结合活性。抗细胞内癌蛋白抗体可结合于细胞内癌蛋白或其表位。抗细胞内癌蛋白抗体可以以相同的、降低的或升高的亲和力或亲合力结合于抗原或表位。例如,与同源抗体例如269,223或318或其人源化对应物相比,抗细胞内癌蛋白抗体可根据情况以至少10%,如20%,如30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或更多的亲和力或亲合力结合于抗原或表位。

[0218] 活性可包括抑制癌症活性,例如由肿瘤大小或肿瘤数量的降低来度量,或抑制转移活性,例如如由实施例中所描述的测定(分析)来测量。可通过在试验动物中引起癌发生,给予该动物抗细胞内癌蛋白抗体并测定与未接受该治疗的相似的对照动物相比抗细胞内癌蛋白抗体的效果来方便地测定所述降低或抑制。实施例详细描述了这样的测定。

[0219] 抗细胞内癌蛋白抗体可具有与同源抗体相同的、降低的或升高的肿瘤抑制或转移抑制活性。例如,与同源抗体例如269,223或318或其人源化对应物相比,抗细胞内癌蛋白抗体根据情况可以为至少10%,如20%,如30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或更加有效。我们的意思是说与未治疗的动物相比,如果同源抗体能够降低90%的肿瘤数量(参见实施例),则抗细胞内癌蛋白抗体能够降低90%,85%,80%,75%,70%,65%,60%,55%,50%,45%,40%,35%,30%等的肿瘤数量。

[0220] 除了所述的测定,也可使用检测抗体事件的其它测定。

[0221] 同源物

[0222] 所公开的抗细胞内癌蛋白抗体多肽包括获自任何来源的同源序列,例如相关的病毒/细菌蛋白,细胞同源物和合成肽,以及其变体或衍生物。因此多肽也包括编码来自其它物种的抗细胞内癌蛋白抗体的同源物的那些,所述其它物种包括动物如哺乳动物(例如小

鼠,大鼠或兔),特别是人类。

[0223] 在本文的上下文中,同源序列或同源物视为包括在氨基酸水平上至少60,70,80或90%相同,如至少95或98%相同的氨基酸序列,至少30以上,如50,70,90或100个氨基酸具有如本文所列出的序列所示的相关多肽序列。在本文的上下文中,同源序列包括在氨基酸水平上至少15,20,25,30,40,50,60,70,80或90%相同,如至少95或98%相同的氨基酸序列,如至少15,25,35,50或100个以上,如200,300,400或500个氨基酸具有相关多肽的序列。虽然也可根据相似度(即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基)来考虑同源性,但在本文的上下文中可以以序列同一性表示同源性。可以相对于有关序列的整个长度来测定序列同一性,即相对于有关基因的序列的整个长度或全长。

[0224] 可通过目测进行同源性比较,或更通常地借助现成的序列比较程序进行比较。市售的计算机程序可计算出两个或多个序列之间的同源性%。

[0225] 可在连续序列中计算同源性%,即将一个序列与其它序列比对,并将一个序列中的每个氨基酸直接与其它序列中的相应氨基酸进行比较,每次一个残基。这称为“无空位”比对。通常,这样的无空位比对仅在相对较少数量的残基上进行(例如小于50个连续氨基酸)。

[0226] 虽然这是非常简单和连续的方法,但其未考虑到例如在相同的序列对中,一个插入或缺失会导致之后的氨基酸残基无法对齐,因此在进行全局比对时可能导致同源性%大幅降低。因此,大多数序列比较方法被设计成产生考虑到可能的插入和缺失的最佳比对,避免对整体同源性分数过度不利。这通过在序列比对中插入“空位”来实现,以试图使局部同源性最大化。

[0227] 然而,这些更复杂的方法将“空位罚分”分配至比对中发生的每个空位中,对于相同数量的相同氨基酸,空位尽可能少的序列比对反映两个比较序列之间具有较高的关联性,会达到比具有许多空位的序列更高的分数。“仿射空位罚分”通常对空位的存在进行相对较高的罚分,并且对空位中每个后续的残基进行较小的罚分。这是最常用的空位评分系统。较高的空位罚分当然会产生具有更少空位的优化的比对。大多数比对程序允许对空位罚分进行修改。

[0228] 然而,当使用这样的软件进行序列比较时可使用默认值。例如当使用GCG Wisconsin Bestfit package(参见下文)时氨基酸序列的默认空位罚分为一个空位-12,且对于每个延伸-4。

[0229] 因此考虑到空位罚分,最大同源性%的计算首先需要而产生最佳比对。用于进行这样的比对的合适的计算机程序为GCG Wisconsin Bestfit package(威斯康辛大学,美国;Devereux等人,1984,Nucleic Acids Research12:387)。可以进行序列比较的其它软件的实例包括但不限于BLAST package(参见Ausubel等人,1999ibid-Chapter 18),FASTA(Atschul等人,1990,J.Mol.Biol.,403-410)和GENEWORKS比较工具套件。BLAST和FASTA均可离线和在线检索(参见Ausubel等人,1999 ibid,第7-58页至7-60页)。可使用GCG Bestfit程序。

[0230] 虽然可根据同一性来测量最后的同源性%,但比对过程本身通常不基于全有或全无的配对比较。相反,通常使用分级相似度得分矩阵,其基于化学相似度或进化距离将分数分配于每个成对比较中。常用的这种矩阵的实例为BLOSUM62矩阵—BLAST程序套件的默认矩阵。GCG Wisconsin程序通常使用公共默认值或自定义符号对照表(如果能够提供)(进一

步的详情参见用户手册)。可使用GCG package的公共默认值,或在其它软件的情况下,可使用默认矩阵,如BLOSUM62。

[0231] 一旦软件产生了最佳比对,即可计算同源性%,如序列同一性%。软件通常将其作为序列比较的一部分来进行,并产生数值结果。

[0232] 变体和衍生物

[0233] 与如本文所述的氨基酸序列相关的术语“变体”或“衍生物”包括一个(或多个)氨基酸从序列中或到序列中的任何替换,变化,修改,代替,缺失或添加。所产生的氨基酸序列可以保持与未修饰序列基本相同的活性,如至少具有与本文例如序列表中所示的抗细胞内癌蛋白抗体多肽相同的活性。因此,可保持序列的主要特征,即如别处所述的与细胞内癌蛋白多肽结合的能力或肿瘤减少活性。

[0234] 可对具有实施例中所示的氨基酸序列的多肽,或其片段或同源物进行修饰以用于本文所述的方法和组合物。通常,进行可保持序列生物活性的修饰。只要修饰的序列保持未修饰序列的生物活性,就可进行例如1,2或3至10,20或30个替换的氨基酸替换。氨基酸替换可包括使用非天然存在的类似物,以提高例如治疗给予的多肽的血浆半衰期。

[0235] 抗细胞内癌蛋白抗体的天然变体可能包括保守的氨基酸替换。可根据例如下表定义保守替换。第二列相同区域中的氨基酸如第三列同一行中的氨基酸可彼此替换:

[0236]

脂肪族	非极性	GAP
		ILV
	极性-不带电	CSTM
		NQ
	极性-带电	DE
		KR
芳香族		HFYW

[0237] 片段

[0238] 本文所公开的多肽和用作标志物的多肽也包括上述全长多肽及其变体的片段,包括序列表所列出的序列片段。

[0239] 多肽也包括任意抗PRL抗体多肽的全长序列的片段。片段可包括至少一个表位。本领域熟知识别表位的方法。片段通常将包括至少6个氨基酸,如至少10,20,30,50或100或更多个氨基酸。

[0240] 抗细胞内癌蛋白抗体蛋白及其等位基因和变体的多肽片段可包含一个或多个(例如,5,10,15或20个)替换,缺失或插入,包括保守替换。当例如在不同物种中发生替换,缺失和/或插入时,例如序列表中所描述的低于50%,40%或20%的氨基酸残基发生改变。

[0241] 可通过重组手段制备抗细胞内癌蛋白抗体及其片段,同源物,变体和衍生物。然而,也可以使用本领域技术人员熟知的技术如固相合成,通过合成手段进行制备。也可将蛋白制备为融合蛋白,例如以有助于提取和纯化。融合蛋白伴侣的实例包括谷胱甘肽-S-转移酶(GST),6xHis,GAL4(DNA结合和/或转录活化结构域)和 β -半乳糖苷酶。也可在融合蛋白伴

侣和感兴趣的蛋白序列之间包括蛋白水解裂解位点以除去融合蛋白序列。使得融合蛋白不会妨碍感兴趣的序列的蛋白功能。也可通过纯化来自动物细胞的细胞提取物来获得蛋白。

[0242] 本文所公开的抗细胞内癌蛋白抗体多肽,变体,同源物,片段和衍生物可为基本分离的形式。将理解到,这样的多肽可与不干扰蛋白预期用途的载体或稀释剂混合,并仍然认为其基本分离。抗细胞内癌蛋白抗体变体,同源物,片段或衍生物也可为基本纯的形式,在该情况下制剂中通常包括大于90%的蛋白,例如制剂中有95%,98%或99%的蛋白。

[0243] 可使用显示标记物对本文所公开的抗细胞内癌蛋白抗体多肽,变体,同源物、片段和衍生物进行标记。显示标记物可为任意合适的标记物,其允许多肽等被检测到。合适的标记物包括放射性同位素,例如¹²⁵I,酶,抗体,多核苷酸和连接子如生物素。标记的多肽可用于诊断程序如免疫测定中以测定样品中多肽的量。多肽或标记的多肽也可用于血清学或细胞介导的免疫测定中以利用标准方案来检测动物和人类对所述多肽的免疫反应性。

[0244] 本文所公开的可选标记的抗细胞内癌蛋白抗体多肽,变体,同源物,片段及衍生物也可固定于固定相,例如免疫测定孔或试纸的表面。该标记的和/或固定的多肽可与合适的试剂,对照品,说明书等在合适的容器中一起包装成试剂盒。这样的多肽和试剂盒可用于通过免疫测定检测抗多肽的抗体或其等位基因或物种变体的方法中。

[0245] 本领域熟知免疫测定方法并通常包括:(a)提供包括抗所述蛋白的抗体可结合的表位的多肽;(b)在允许形成抗体-抗原复合物的条件下,使用所述多肽孵化生物样品;和(c)测定是否形成包括所述多肽的抗体-抗原复合物。

[0246] 本文所公开的抗细胞内癌蛋白抗体多肽,变体,同源物,片段和衍生物可用于体外或体内细胞培养系统中,以研究其相应基因和其同源物在细胞功能中的作用,包括其在疾病中的功能。例如,可将截短或修饰的多肽引入到细胞中以干扰细胞中发生的正常功能。可通过由重组表达载体原位表达多肽来将多肽引入到细胞中(参见下文)。表达载体可选地携带可诱导的启动子来控制多肽的表达。

[0247] 合适的宿主细胞如昆虫细胞或哺乳动物细胞的使用预期可提供赋予重组表达产物最佳的生物活性所需的转录后修饰(例如十四烷酰化,糖基化,截短,脂化和酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸磷酸化)。表达本文所公开的抗细胞内癌蛋白抗体多肽,变体,同源物,片段和衍生物的细胞培养系统可用于测定系统中从而确定干扰或提高细胞内多肽功能的候选物质。

[0248] 多核苷酸序列

[0249] 可变区,单克隆抗体序列和人源化抗体序列可包括多核苷酸。它们可包括DNA或RNA。

[0250] 它们可为单链或双链。它们也可为内部包括合成或修饰核苷酸的多核苷酸。本领域已知许多对寡核苷酸进行的不同类型的修饰。这些包括甲基膦酸酯和磷硫酰骨架,在分子的3'和/或5'端添加吡啶或聚赖氨酸链。对于本文的目的,应当理解,可通过本领域任何可用的方法来修饰本文所述的多核苷酸。可进行这样的修饰以提高多核苷酸的体内活性或寿命。

[0251] 当多核苷酸为双链时,单独或组合的双螺旋的两条链均包括在本文所述的方法和组合物中。当多核苷酸为单链时,应理解也包括该多核苷酸的互补序列。

[0252] 变体、衍生物和同源物

[0253] 与本文所述的核苷酸序列相关的术语“变体”,“同源物”或“衍生物”包括一个(或

多个)氨基酸从序列中或到序列中的任何替换,变化,修改,代替,缺失或添加。如本文别处所述的,所产生的序列能够编码具有细胞内癌蛋白结合活性的多肽。

[0254] 如上所述,对于序列同一性,“同源物”与相关序列具有如至少5%的同一性,至少10%的同一性,至少15%的同一性,至少20%的同一性,至少25%的同一性,至少30%的同一性,至少35%的同一性,至少40%的同一性,至少45%的同一性,至少50%的同一性,至少55%的同一性,至少60%的同一性,至少65%的同一性,至少70%的同一性,至少75%的同一性,至少80%的同一性,至少85%的同一性,至少90%的同一性,或至少95%的同一性。

[0255] 可具有至少95%的同一性,如至少96%的同一性,如至少97%的同一性,如至少98%的同一性,如至少99%的同一性。如上所述进行核苷酸同源比较。因此可使用序列比较程序如上述的GCG Wisconsin Bestfit程序。默认得分矩阵对每个相同核苷酸的匹配值为10,并且对每个不匹配为-9。每个核苷酸的默认的空位产生罚分为-50,并且默认的空位延伸罚分为-3。

[0256] 杂交

[0257] 我们进一步描述了能够与任意本文所述序列如269,223和318可变区,抗体和人源化抗体或其任意变体、片段或衍生物,或与任意上述序列的互补序列选择性杂交的核苷酸序列。核苷酸序列的长度至少为15个核苷酸,如长度为至少20,30,40或50个核苷酸。

[0258] 如本文所使用的术语“杂交”可包括“核酸链通过碱基配对与互补链结合的过程”以及如在聚合酶链反应技术中进行的扩增过程。

[0259] 能够选择性与本文所述的核苷酸或其互补序列杂交的多核苷酸通常至少有70%,如至少80或90%和如至少95%或98%与本文所述的相应核苷酸序列的同源性,有至少20个以上,如至少25或30个,例如至少40,60或100个或更多连续核苷酸的区域。

[0260] 术语“可选择性杂交”是指在靶多核苷酸能够与探针在显著高于背景的水平下杂交的条件下将多核苷酸用作探针。由于存在例如在所筛选的cDNA或基因组DNA库中的其它多核苷酸,因此会发生背景杂交。在该情况下,背景表明由探针和库中的非特异性DNA成员之间相互作用而产生的信号水平,其比使用靶DNA所观察到的特异性相互作用的强度低10倍,如低100倍。可通过例如使用³²P放射性标记探针来测量相互作用的强度。

[0261] 如Berger和Kimmel(1987,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology,Vol 152,Academic Press,San Diego CA)中所教导的,杂交条件基于核酸结合复合物的解链温度(T_m),并对“严格度”进行定义,解释如下。

[0262] 最大严格度通常发生在约T_m-5°C下(比探针的T_m低5°C);高严格度发生在比T_m低约5°C至10°C下;中等严格度发生在比T_m低约10°C至20°C下;并且低严格度发生在比T_m低约20°C至25°C下。如本领域技术人员所理解的,最大严格度杂交可用于识别或检测相同的多核苷酸序列,而中等(或低)严格度杂交可用于识别或检测相似或相关的多核苷酸序列。

[0263] 我们公开了在严格条件下可以与核酸或其片段,同源物,变体或衍生物杂交的核苷酸序列(例如65°C和0.1xSSC {1xSSC=0.15M NaCl,0.015M Na₃柠檬酸pH 7.0})。

[0264] 当多核苷酸为双链时,单独或组合的双螺旋的两条链均包括在本文中。在多核苷酸为单链的情况下,应当理解,也公开并包括该多核苷酸的互补序列。

[0265] 可通过许多方式获得与本文所公开的序列非100%同源并落入公开范围内的多核苷酸。可通过探测由一系列个体例如来自不同群体的个体制备的DNA库来获得本文所述序

列的其它变体。此外,可获得其它病毒/细菌,或细胞同源物特别是哺乳动物细胞(例如大鼠,小鼠,牛和灵长类动物细胞)中的细胞同源物,并且这样的同源物及其片段通常能够选择性与本文的序列表中所示的序列杂交。可通过在中度至较高严格度的条件下,探测来自其它动物物种的cDNA库或基因组DNA库,并使用包括所有或部分所公开的序列的探针探测该库来获得这样的序列。

[0266] 本文所述的多核苷酸可用于产生引物,例如PCR引物,用于可替换的扩增反应的引物,探针例如使用放射性或非放射性标记物通过常规手段使用显示标记物标记的探针,或者可以将多核苷酸克隆到载体中。这样的引物,探针和其它片段的长度将为至少15,如至少20,例如至少25,30或40个核苷酸,并且包括在如本文所使用的术语多核苷酸中。片段的长度可低于500,200,100,50或20个核苷酸。

[0267] 可重组性地,合成性地或借助本领域技术人员可用的任意手段来制备多核苷酸如DNA多核苷酸和探针。也可通过标准技术克隆得到。

[0268] 通常,可通过合成手段制备引物,其涉及分步制备所需的核酸序列,每次一个核苷酸。本领域中可以容易地获得使用自动化技术实现其的技术。

[0269] 通常可使用重组手段来制备更长的多核苷酸,例如使用PCR(聚合酶链反应)克隆技术。这会涉及制备位于所需克隆序列区域侧面的一对引物(例如约15至30个核苷酸),将引物与获自动物或人类细胞的mRNA或cDNA接触,在能够引起所需区域扩增的条件下进行聚合酶链反应,分离扩增的片段(例如通过在琼脂糖凝胶上纯化反应混合物)并回收扩增的DNA。引物可被设计成包含合适的限制性内切酶识别位点,从而可以将扩增的DNA克隆到合适的克隆载体中。

[0270] 细胞内癌蛋白多肽和核酸

[0271] 如前面的段落所述,细胞内癌蛋白多肽同源物,变体,衍生物和片段可以类似地进行定义。

[0272] 在上下文许可的情况下,提及细胞内癌蛋白多肽应包括对细胞内癌蛋白多肽同源物,变体,衍生物或片段的提及。类似地,对细胞内癌蛋白多肽的提及应包括对细胞内癌蛋白多肽同源物,变体,衍生物或片段的提及。

[0273] 类似地,在上下文许可的情况下,对细胞内癌蛋白核酸的提及应视为包括对细胞内癌蛋白核酸同源物,变体,衍生物或片段的提及。类似地,对细胞内癌蛋白多肽的提及应视为包括对细胞内癌蛋白核酸同源物,变体,衍生物或片段的提及。

[0274] 抗细胞内癌蛋白抗体的制备

[0275] 可通过本领域普通技术人员熟知的重组DNA方法或合成肽化学方法来制备抗细胞内癌蛋白抗体。

[0276] 例如,可通过本领域熟知的技术来合成抗细胞内癌蛋白抗体,如通过“Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach”E.Atherton and R.C.Sheppard, IRL Press,Oxford England所列举的。类似地,可合成多个片段并随后将其连接在一起以形成更大的片段。这些合成肽片段也可通过特定位置上的氨基酸替换来制备,以便测试体外和体内活性。

[0277] 可在标准微量化学设备中合成抗细胞内癌蛋白抗体并使用HPLC和质谱来检查纯度。本领域技术人员已知肽合成、HPLC纯化和质谱的方法。

[0278] 也可在体外和体内条件下,在纳入本文所述的DNA序列(如可变序列)或其等位基因变体的转化的宿主细胞中表达抗细胞内癌蛋白抗体,其可用于预防和/或治疗癌症相关疾病。

[0279] 术语“载体”包括表达载体和转化载体。术语“表达载体”是指能够体内或体外表达的构建体。术语“转化载体”是指能够从一个物种转移至另一个物种的构建体。

[0280] 可用于表达的载体包括重组病毒载体,特别是重组逆转录病毒载体(RRV)如慢病毒载体,腺病毒载体,包括逆转录病毒载体的组合。

[0281] 术语“重组逆转录病毒载体”(RRV)是指具有足够逆转录病毒遗传信息的载体,在装配组件存在下其允许RNA基因组装配到能够感染靶细胞的病毒颗粒中。感染靶细胞包括逆转录和整合到靶细胞基因组中。通过载体将RRV携带的非病毒编码序列传送至靶细胞中。RRV在最终的靶细胞中无法独立复制从而产生感染性的逆转录病毒颗粒。RRV通常缺乏复制所必需的功能性gag pol和/或env基因和/或其它基因。可使用的载体包括重组痘病毒载体如禽痘病毒(FPV),昆虫痘病毒,牛痘病毒如NYVAC,金丝雀痘病毒,MVA或其它非复制型病毒载体系统,例如W09530018中所描述的那些系统。

[0282] 可基因工程改造痘病毒以进行重组基因表达并在双重免疫治疗方法中用作重组活疫苗。使用减毒活病毒如病毒作为递送工具和/或基于载体的疫苗候选物的主要依据源于其能够引发细胞介导的免疫应答。如上所述,能够采用病毒载体作为递送工具和基于载体的疫苗候选物,是由于它们的结构蛋白具有免疫原性,可充当佐剂以提高免疫应答,从而使所关注的核苷酸序列(NOI)如编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列具有更强的免疫原性。

[0283] 痘病毒疫苗策略已使用重组技术将NOI引入到痘病毒的基因组中。如果NOI整合至病毒的生命周期非必需的病毒DNA中的位点时,新产生的重组痘病毒可能具有感染性,也就是说可感染外来细胞并因此表达整合的NOI。以该方式制备的重组痘病毒可用作活疫苗以预防和/或治疗病理性和感染性疾病和/或癌症。

[0284] 对痘病毒载体递送系统的其它要求包括良好的免疫原性和安全性。MVA为复制受损的牛痘株,其具有良好的安全性记录。在大多数细胞类型和正常人体组织中,MVA不能复制。在几种转化的细胞类型如BHK21细胞中可观察到MVA的有限复制。Carroll等人(1997 Vaccine 15:387-394)已表明重组MVA在产生保护性CD8+T细胞应答时与传统重组牛痘载体一样好,可有效替代更常用的能够复制的牛痘病毒。来自MVA或独立形成的具有使MVA特别适用于疫苗中的MVA特征的病毒株的牛痘病毒株也适合用作递送工具。

[0285] 可将所关注的并且需要表达的核苷酸序列操作性地连接于转录单位。如本文所述的术语“转录单位”为包含编码序列以及用于实现这些编码序列独立于任何其它编码序列表达的信号的核酸区域。因此,每个转录单位通常包括至少一个启动子,可选的增强子和多腺苷酸化信号。术语“启动子”在本领域通常意义上用于例如RNA聚合酶结合位点。启动子可包含增强子元件。术语“增强子”包括DNA序列,其结合于转录起始复合物的其它蛋白组件,从而可促进其相关启动子所涉及的转录启动。术语“细胞”包括任意合适的生物体。细胞可包括哺乳动物细胞,如人体细胞。

[0286] 术语“转化细胞”是指具有修饰的遗传结构的细胞。例如,如本文所述的,当将载体如表达载体引入到细胞中时,该细胞具有修饰的遗传结构。术语“生物体”包括任意合适的

生物体。生物体可包括哺乳动物如人类。

[0287] 本文所述术语“转基因生物体”是指包括修饰的遗传结构的生物体。例如,如果将载体如表达载体引入到生物体中时,该生物体可以具有修饰的遗传结构。

[0288] 抗体表达

[0289] 我们进一步描述了包括使用本文所述的核苷酸序列,抗体序列或人源化抗体序列转化宿主细胞的方法。

[0290] 我们也提供了包括培养转化宿主细胞的方法,其中在适合于表达由核苷酸序列编码的抗细胞内癌蛋白抗体的条件下,使用所述核苷酸序列转化所述宿主细胞。

[0291] 我们进一步提供了包括培养转化宿主细胞以及从转化的宿主细胞培养物中回收所述抗细胞内癌蛋白抗体的方法,其中在适合于表达由核苷酸序列编码的抗细胞内癌蛋白抗体的条件下,使用所述核苷酸序列转化所述宿主细胞。

[0292] 因此,编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列,其融合蛋白或功能等价物可用于产生重组DNA分子,其在合适的宿主细胞中进行表达。

[0293] 例如,可在重组大肠杆菌,酵母或哺乳动物表达系统中制备抗细胞内癌蛋白抗体,并使用柱色谱纯化。

[0294] 在某些情况下使用抗体片段而非整个抗体具有优势。片段的较小尺寸可以使得快速清除并可引起肿瘤与非肿瘤比升高。Fab,Fv,ScFv抗体片段均可在大肠杆菌中表达并分泌自其,从而使得大量制备这样的片段。

[0295] 可将编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列操作性地连接于能够使编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列在合适的宿主细胞中表达的启动子序列。当插入到宿主细胞中时,可在适宜条件下培养转化的宿主细胞直到抗细胞内癌蛋白抗体达到足够水平,随后可裂解细胞并分离抗细胞内癌蛋白抗体。

[0296] 使用编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列转化的宿主细胞可在适合抗细胞内癌蛋白抗体表达和从细胞培养物中回收的条件下进行培养。根据序列和/或所使用的载体,由重组细胞产生的蛋白可分泌出来或可以包含在细胞内。如本领域技术人员将理解到的,表达载体包含

[0297] 可将编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列设计为具有信号序列,其使得编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列通过特定的原核或真核细胞膜而直接分泌。其它重组结构可将编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列连接于编码多肽结构域的核苷酸序列,这将有助于可溶性蛋白的纯化(Kroll DJ等人(1993)DNA Cell Biol 12:441-5 3',也可参见以下对含有融合蛋白的载体的讨论)。

[0298] 抗细胞内癌蛋白抗体可表达为具有一个或多个另外的多肽结构域的重组蛋白,增加所述多肽结构域以促进蛋白纯化。促进这样的纯化的结构域包括但不限于可在固定化的金属上纯化的金属螯合肽如组氨酸-色氨酸模块(Porath J (1992)Protein Expr Purif 3:263-281),可在固定化的免疫球蛋白上纯化的蛋白A结构域,以及在FLAGS延伸/亲和纯化系统(Immunex Corp,Seattle,WA)中利用的结构域。纯化结构域和抗细胞内癌蛋白抗体之间的可裂解的连接子序列的内含子如因子XA或肠激酶(Invitrogen, San Diego,CA)可用于促进纯化。

[0299] 可由于各种原因对本文所述的核苷酸序列进行基因工程改造以改变编码抗细胞

内蛋白抗体的序列,包括但不限于修饰基因产物的克隆,处理和/或表达的改变。例如,可使用本领域熟知的技术如定点突变来引入突变,以插入新的限制性内切酶位点,从而改变糖基化模式或改变密码子偏爱性。

[0300] 在另一个实施方式中,编码天然、修饰或重组抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列可连接于异源序列以编码融合蛋白。例如,可制备包括与亲和标记物连接的抗细胞内癌蛋白抗体或其酶活性片段或衍生物的融合蛋白,所述亲和标记物例如谷胱甘肽-S-转移酶(GST),生物素,His6,ac-myc标记物(参见Emrich等人1993 *BiocemBiophys Res Commun* 197(1):21220),血细胞凝集素(HA)(如Wilson等人(1984 *Cell* 37 767)所述)或FLAG表位(Ford等人1991 *Protein Expr Purif* Apr;2(2):95-107)。

[0301] 重组融合蛋白可以包括抗原共蛋白如GST, β -半乳糖苷酶或来自流感嗜血杆菌的脂蛋白D,其为相对较大的共蛋白,可增溶并促进其制备和纯化。可替换地,融合蛋白可包括载体蛋白如牛血清白蛋白(BSA)或锁孔戚血蓝蛋白(KLH)。在某些实施方式中,标记物序列可包括如pQE vector(Qiagen Inc)所提供以及在Gentz等人(1989 *PNAS* 86:821-824)中所描述的六组氨酸肽。这样的融合蛋白在酵母培养物中易于表达(如在Mitchell等人1993 *Yeast* 5:715-723中所述)并易于通过亲和色谱纯化。也可对融合蛋白进行基因工程改造使其在位于编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列和异源蛋白序列之间包含裂解位点,使得裂解并从异源部分中纯化抗细胞内癌蛋白抗体。在另一个实施方式中,使用整个结合的融合蛋白进行靶蛋白测试。可替换地,在提供广泛的免疫系统刺激的意义上,共蛋白可充当佐剂。共蛋白可连接于第一蛋白的氨基或羧基末端。

[0302] 虽然标志物基因表达的存在/不存在表明抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列存在,但应证实其存在和表达。例如,如果编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列插入到标志物基因序列中,则通过标记物基因功能的缺失来确定重组细胞含有编码抗细胞内癌蛋白抗体区域。可替换地,在单一启动子的控制下,标记物基因可与编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列串联设置。

[0303] 在应答诱导或选择时,标记物基因的表达也通常表明抗细胞内癌蛋白抗体的表达。

[0304] 定量特定分子表达的其它方法包括放射性标记(Melby PC等1993 *J Immunol Methods* 159:235-44)或将核苷酸生物素化(Duplaa C等人1993 *Anal Biochem* 229-36),与对照核酸共同扩增,以及标准曲线,通过内插实验结果来计算。

[0305] 可通过以ELISA格式进行测定来提高多个样品的定量,其中所关注的抗细胞内癌蛋白抗体以各种稀释度存在,并且分光光度测量或热量测量反应可提供快速定量。

[0306] 制备或使用的改变的抗细胞内癌蛋白抗体核苷酸序列包括不同核苷酸残基的缺失,插入或替换,这产生编码相同或功能等价的抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列。例如,所表达的抗细胞内癌蛋白抗体的氨基酸残基也具有缺失,插入或替代,其产生轻微变化并产生功能等价的抗细胞内癌蛋白抗体。只要能够保持抗细胞内癌蛋白的结合亲和力,就可根据残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性的相似度进行有意的氨基酸替换。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;并且具有不带电的极性首基并具有相似亲水性值的氨基酸包括亮氨酸,异亮氨酸,缬氨酸,甘氨酸,丙氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,苯丙氨酸,和酪氨酸。

[0307] 可采用基因疗法,由此调节如本文所述的编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列。例如可通过给予化合物来实现表达的调节,所述化合物可与编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列结合,或控制与编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列相关的区域或其相应的RNA转录本,以调节转录或翻译的速率。

[0308] 例如,本文所述的编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列可在表达调节元件的表达控制下,通常为启动子或启动子和增强子。增强子和/或启动子可优先在缺氧或缺血或低葡萄糖环境下具有活性,以使编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列优先在所感兴趣的特定组织中表达,如在肿瘤细胞或细胞团的环境中。因此,编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列对治疗的个体的任何显著的生物效应或有害效应可降低或消除。增强子元件或其它调节表达的元件可存在于多拷贝中。

[0309] 启动子和/增强子可具有结构有效性,或其活性可以具有组织或时间特异性。合适的组织特异性启动子/增强子的实例为在肿瘤细胞中具有高度活性的那些,如来自MUC1基因,CEA基因或STV抗原基因的启动子/增强子。时间特异性启动子/增强子的实例为响应缺血和/或缺氧的那些,如缺氧应答元件或agrp78或agrp94基因的启动子/增强子。甲胎蛋白(AFP)启动子也为肿瘤特异性启动子。另一种启动子-增强子组合为人类巨细胞病毒(hCMV)主要即刻早期(MIE)启动子/增强子组合。

[0310] 启动子可以是组织特异性的。即,它们能够驱使编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列在一种组织中转录,而在其它组织类型中基本保持“沉默”。

[0311] 术语“组织特异性”是指启动子的活性不限于单一组织类型中,但仍然显示选择性,即其可在一组组织中具有活性,并且在另一组组织中活性较低或沉默。这样的启动子的期望特性为在缺乏活化缺氧调节的增强子元件时,即使在靶组织中其仍然具有相对较低的活性。实现该特性的一种手段为使用“沉默子”元件,其可在不缺氧时抑制所选择的启动子的活性。

[0312] 术语“缺氧”是指特定器官或组织所接受的氧气供应不足的条件。

[0313] 在特定启动子的控制下,编码抗细胞内癌蛋白抗体的核苷酸序列的表达水平可通过操纵启动子区域来调节。例如,启动子区域内的不同结构域可具有不同的基因调节活性。通常使用载体构建体来评估这些不同区域的作用,所述载体构建体具有删除了特异区域的不同启动子变体(即缺失分析)。该方法可用于识别例如能够赋予组织特异性的最小区域或赋予缺氧敏感性的最小区域。

[0314] 可使用上述许多组织特异性启动子。在大多数情况下,可将这些启动子分离为适于在所选择的载体中克隆的方便的限制性消化片段。可替换地,可使用聚合酶链反应来分离启动子片段。可通过在引物的5'端并入限制性酶切位点来促进扩增片段的克隆。

[0315] 组合治疗

[0316] 本文所述的方法和组合物,包括抗细胞内癌蛋白抗体和细胞内癌蛋白疫苗,可与其它组合物和程序联合使用以用于治疗疾病。

[0317] 例如,抗细胞内癌蛋白抗体和细胞内癌蛋白疫苗也可与疾病如癌症的传统治疗组合使用。例如,通常使用手术,放疗或化疗与抗细胞内癌蛋白抗体联合治疗肿瘤,和/或随后可给予患者细胞内癌蛋白疫苗以延长微转移的休眠期并稳定任何残余的原发肿瘤。

[0318] 可在相同时间和相同位点给予抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗与治

疗有效的药剂。可替换地,可在不同时间和不同位点给予抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗以及治疗有效量的药剂。甚至可在相同递送工具(递送载体)中给予抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗以及治疗有效量的药剂以预防和/或治疗癌症。

[0319] 抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗可与细胞毒药剂组合使用以预防和/或治疗血管发生和/或癌症。连接于抗细胞内癌蛋白抗体、抗细胞内癌蛋白抗体抗血清、抗细胞内癌蛋白抗体受体激动剂和拮抗剂的细胞毒药剂如蓖麻毒素提供了破坏表达细胞内癌蛋白的细胞或细胞内癌蛋白的工具。这些细胞可存在于许多部位,包括但不限于微转移和原发肿瘤。

[0320] 在基因治疗中,抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗可与前药活化酶组合使用。与在靶组织中选择性表达相反或相同,抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗可与另一种分子组合使用,如前药活化酶或无明显作用或无有害作用,直到使用一种或多种前药对个体进行治疗时才起作用的酶。在前药活化酶的存在下,使用合适的前药对个体进行积极治疗可提高肿瘤生长或生存的降低。

[0321] 前药活化酶可递送至肿瘤位点以治疗癌症。在每种情况下,合适的前药与合适的前药活化酶组合用于治疗患者。合适的前药与载体共同给予。前药的实例包括:磷酸依托泊苷(与碱性磷酸酶作用,Senter等人1988 Proc Natl Acad Sci 85:4842-4846);5-氟胞嘧啶(与胞嘧啶脱氨酶作用,Mullen等人1994 Cancer Res 54:1503-1506);多柔比星-N-p-羟基苯氧基乙酰胺(与青霉素-V-酰化酶作用,Kerr等人1990 Cancer Immunol Immunother 31:202-206);对-N-双(2-氯乙基)氨基苯甲酰基谷氨酸(与羧肽酶G2作用);头孢菌素氮芥氨基甲酸酯(与 β -内酰胺酶作用);SR4233(与P450还原酶作用);更昔洛韦(与HSV胸苷激酶作用,Borrelli等人1988 Proc Natl Acad Sci 85:7572-7576);与硝基还原酶作用的氮芥前药(Friedlos等人1997 J Med Chem 40:1270-1275)和环磷酰胺(与P450作用,Chen等人/1996 Cancer Res 56:1331-1340)。

[0322] 前药活化酶的实例包括可活化5-氟尿嘧啶前药卡培他滨和氟铁龙胸苷磷酸化酶;可活化更昔洛韦的来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶;可将前药如环磷酰胺活化为DNA损伤剂的细胞色素P450;以及可活化5-氟胞嘧啶的胞嘧啶脱氨酶。可以使用人来源的酶。

[0323] 其它合适的分子包括具有治疗性和/或诊断性应用的那些分子,例如但不限于:编码序列的细胞因子,趋化因子,激素,抗体,基因改造的免疫球蛋白样分子,单链抗体,融合蛋白,酶,免疫共刺激分子,免疫调节分子,反义RNA,靶蛋白的反式显性突变体,毒素,条件毒素,抗原,肿瘤抑制蛋白和生长因子,膜蛋白,血管活性蛋白和肽,抗病毒蛋白和核酶,以及它们的衍生物(如具有相关的报道基团)。当包括时,这样的编码序列通常可操作性地连接于合适的启动子,其可以为驱动核酶表达的启动子,或不同的一个或多个启动子,如在一种或多种特异细胞类型中。

[0324] 分子可为细胞分泌的蛋白。可替换地,分子不被分泌且在细胞内具有活性。在任一事件中,分子可以显示旁观者效应或远距离旁观者效应;即在一个细胞中产生表达产物导致邻近或远距离(例如转移)的具有相同表型的其它相关细胞的杀灭。

[0325] 用于治疗或预防癌症的合适分子包括蛋白(或编码蛋白的核酸),其:破坏靶细胞(例如核糖体毒素),充当:肿瘤抑制物(如野生型p53),抗肿瘤免疫机制的活化剂(如细胞因子,共刺激分子和免疫球蛋白);血管发生的抑制剂;或使药物敏感性提高(如前药活化酶);

通过天然效应细胞间接刺激靶细胞的破坏(例如刺激免疫系统的较强抗原)或将前体物质转化为可破坏靶细胞的有毒物质(例如前药活化酶)。编码蛋白也可破坏旁观者肿瘤细胞(例如通过分泌的抗肿瘤抗体-核糖毒素融合蛋白),间接刺激旁观者肿瘤细胞的破坏(例如刺激免疫系统的细胞因子或导致局部血管阻塞的促凝血蛋白)或将前体物质转化为破坏旁观者肿瘤细胞的有毒物质(例如将前药活化为可扩散药物的酶)。

[0326] 干扰使肿瘤持续存在的细胞基因表达的反义转录或核酶(例如针对Burkitts淋巴瘤中的异常myc转录本或针对慢性粒细胞白血病中的bcr-abl转录本)可给予以提高抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗的癌细胞杀伤功能或转移预防功能。也设想使用该分子的组合。

[0327] 可调节缺氧的治疗性分子的实例可以见PCT/GB95/00322(WO-A-9521927)。

[0328] 抗细胞内癌蛋白抗体结合物

[0329] 本文所述的使用抗细胞内癌蛋白抗体靶向表达内癌蛋白抗原的细胞有利于调节表达细胞内癌蛋白的细胞活性的药物的发展。

[0330] 可合成不同的抗细胞内癌蛋白抗体以用于不同应用,包括但不限于将抗细胞内癌蛋白抗体与细胞毒药剂连接以靶向性杀灭与抗细胞内癌蛋白抗体结合的细胞。

[0331] 可使用标准方法将本文所述的抗细胞内癌蛋白抗体偶联于其它分子。可使用多种技术对抗细胞内癌蛋白抗体的氨基和羧基末端进行同位素或非同位素标记,例如使用传统技术进行放射性标记(酪氨酸残基-氯胺T,iodogen,乳过氧化物酶;赖氨酸残基-Bolton-Hunter试剂)。本领域技术人员熟知这些偶联技术。根据氨基酸具有的官能团选择偶联技术,所述官能团包括但不限于氨基,巯基,羧基,酰胺,苯酚,和咪唑。其中用于作用于这些偶联的各种试剂包括戊二醛,重氮联苯胺,碳二亚胺,和p-苯醌。

[0332] 抗细胞内癌蛋白抗体可化学偶联于同位素,酶,载体蛋白,细胞毒药剂、荧光分子和其它化合物以用于各种应用。使用适合特异性反应的不同技术来测定偶联反应的效率。例如,使用具有高特异性活性的氯胺T和 Na^{125}I 来实现抗细胞内癌蛋白的 ^{125}I 放射性标记。使用焦亚硫酸钠终止反应并在一次性柱上对其进行脱盐。将标记的抗体从柱上洗脱并收集馏分。从每份馏分中取出等份并在伽马计数器中测量放射性。通过该方式将未反应的 Na^{125}I 与标记的细胞内癌蛋白多肽分离。将具有最高特异性放射性的肽馏分储存用于后续使用,如分析与抗细胞内癌蛋白抗体结合的能力。

[0333] 使用具有短寿命同位素的标记的抗细胞内癌蛋白抗体可实现使用放射自显影或现代放射照相或其它膜结合技术如正电子发射断层扫描对体内细胞内癌蛋白结合位点进行可视化定量,以定位具有抗细胞内癌蛋白抗体结合位点的肿瘤。该应用提供了重要的诊断和研究工具。

[0334] 在其它实施方式中,抗细胞内癌蛋白抗体可偶联于闪烁的放射性标记物,细胞毒化合物或放射性同位素,用于将非毒性前药转化为细胞毒药物的酶,用于活化免疫系统以便将所产生的结合物靶向至结肠肿瘤的化合物,或细胞刺激性化合物。这样的结合物具有由抗细胞内癌蛋白抗体组成的“结合部分”,和由放射性标记物、毒素或酶组成的“功能部分”。

[0335] 可以可替换地单独使用抗体以便单独阻断细胞内癌蛋白抗原的活性,尤其是通过物理干扰其与另一种化合物的结合。

[0336] 可通过任何交联多肽的传统方式将结合物(也可以是肽或多肽)的结合部分和官能部分连接起来,如通常O'Sullivan等所描述的方法(Anal.Biochem 1979:100,100-108)。例如,一部分可以富含硫醇基团,并且将其它部分与能够与那些硫醇基团反应的双功能试剂进行反应,例如碘乙酸的N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHIA)或N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP)。酰胺和硫醚键,例如m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯所实现的,在体内通常比二硫键更稳定。

[0337] 另外,如果结合部分包含碳水化合物,如在抗体或某些抗体片段的情况下,可使用EP 0 088 695中的连接技术,通过碳水化合物部分连接功能部分。

[0338] 结合物的功能部分可以为将无毒前药转化为毒性药物的酶,例如Bagshawe及其同事的结合物(Bagshawe(1987)Br.1.Cancer 56,531;Bagshawe等(Br.1.Cancer 1988:58,700);WO 88/07378)或氰化物释放系统(WO 91/11201)。

[0339] 当抗细胞内癌蛋白抗体结合物用于诊断时,抗细胞内癌蛋白抗体结合物的功能部分可包括或由用于闪烁研究的放射性原子例如锝^{99m}(^{99m}Tc)或碘¹²³(¹²³I),或用于核磁共振(nmr)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记物如碘-123,碘-313,铟-111,氟-19,碳-13,氮-15,氧-17,钆,锰或铁组成。

[0340] 当用于化合物中以选择性破坏肿瘤时,抗细胞内癌蛋白抗体的功能部分可包括能够发射足够能量以破坏邻近细胞的高放射性的原子,如碘-131,铯-186,铯-188,钇-90或铅-212,或细胞毒化合物如氨甲喋呤,阿霉素,长春花生物碱类(长春新碱,长春碱,依托泊苷),柔红霉素或其它插入剂。

[0341] 可以一已知方式将放射性或其它标记物并入抗细胞内癌蛋白抗体结合物中。例如,可生物合成或使用合适的氨基酸前体通过化学氨基酸合成来合成肽,所述氨基酸前体涉及例如氢被氟-19取代。可通过肽中的半胱氨酸残基连接标记物,如^{99m}Tc,¹²³I,¹⁸⁶Rh,¹⁸⁸Rh和¹¹¹In。钇-90可通过赖氨酸残基连接。IODOGEN法(Fraker等(1978)Biochem.Biophys.Res.Comm.80:49-57)可用于纳入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal,CRC Press 1989)详细描述了其它方法。

[0342] 不需要整个酶都存在于结合物中,但是催化部分当然必须存在。可使用所谓的“抗体酶”,其中将抗细胞内癌蛋白抗体与涉及要催化的反应的化合物相连,其通常为反应中间态。然后所产生的抗体可充当用于反应的酶。

[0343] 可通过尺寸排阻色谱或亲和色谱来纯化结合物,并测试其双重生物活性。使用具有固定化抗原的酶联免疫吸附试验(ELISA)和在活细胞放射免疫测定中测定抗原免疫反应性。酶测定可用于β-葡萄糖苷酶,其使用当葡萄糖残基水解时吸光度改变的底物,如oNPG(o-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷)释放2-硝基苯酚,其可在405nm处使用分光光度计测量。

[0344] 首先通过在37°C下在血清中孵化,随后进行尺寸排阻FPLC分析来体外测定结合物的稳定性。可以以相同方式通过分析注射结合物后的小鼠不同时间的血清来测定体内稳定性。此外,在结合前可以使用¹²⁵I放射性标记抗细胞内癌蛋白抗体和使用¹³¹I标记酶,并测定结合物、游离抗细胞内癌蛋白抗体和游离酶在动物如小鼠体内的生物分布。

[0345] 可替换地,可通过重组DNA技术将结合物制备为融合化合物,其中DNA的长度分别包括编码结合物两部分的区域,其彼此相邻或由编码连接肽的区域隔开,并且未破坏结合物的所需性质。

[0346] 可以想象,化合物的两个功能部分可完全或部分重叠。随后通过已知方式在合适的宿主中表达DNA。

[0347] 诊断试剂盒

[0348] 我们也公开了诊断方法和试剂盒,其用于检测和测量生物流体和组织中的细胞内癌蛋白,以及用于定位组织中的细胞内癌蛋白。

[0349] 抗细胞内癌蛋白抗体也可用于诊断方法和试剂盒中,以检测并量化能够结合细胞内蛋白的抗体。这些试剂盒可实现细胞内癌蛋白的检测,所述细胞内癌蛋白在某些情况下可指示原位原发肿瘤的微转移的分布。具有该循环的抗细胞内癌蛋白抗体的患者可能更易患肿瘤和癌症,并且在治疗后或缓解期可能更易复发癌症。

[0350] 也考虑测量细胞内癌蛋白的试剂盒。可使用具有高效价和特异性的抗细胞内癌蛋白抗体建立易于使用的试剂盒,以快速、可靠、灵敏和特异地测量并在血浆、尿液、组织的提取物以及在细胞培养基中定位细胞内癌蛋白。

[0351] 这些分析试剂盒包括但不限于以下技术:竞争性和非竞争性测试,放射免疫分析,生物发光和化学发光分析,荧光分析,夹心分析,免疫放射分析,斑点印迹,酶联分析包括ELISA,微量滴定板,包被抗体以快速监测尿液或血液的条带或试纸,以及免疫细胞化学。针对每个试剂盒,建立分析的范围,灵敏度,精密度,可靠度,特异性和重现性。在位移或活性标准曲线的20%,50%和80%的点上建立批内分析和批间分析变化。

[0352] 在研究和临床中常用的分析试剂盒的一个实例为放射免疫分析(RIA)试剂盒。成功对抗细胞内癌蛋白抗体进行放射性碘标记并纯化后,将具有最高效价的抗血清以几种稀释度加入到含有量相对恒定的放射活性如10,000cpm的合适缓冲系统的管中。其它管含有缓冲液或预免疫血清,以测定非特异性结合。在4°C下孵化24小时之后,加入蛋白A并涡旋振荡管,在室温下孵化90分钟,并且以约2000-2500倍g在4°C下离心以使结合于标记的抗细胞内癌蛋白抗体的抗血清复合物沉淀。通过吸除而除去上清液并使用伽马计数器计算沉淀物的放射性。进一步表征减去非特异性结合后与约10至40%标记的抗细胞内癌蛋白抗体结合的抗血清稀释度。

[0353] 免疫组织化学试剂盒也可用于定位组织和细胞中的细胞内癌蛋白。该免疫组织化学试剂盒提供说明书,抗细胞内癌蛋白抗体,和连接于荧光分子如异硫氰酸荧光素或用于可视化主要抗血清的其它试剂的可能的阻滞血清和第二抗血清。本领域技术人员熟知免疫组织化学技术。

[0354] 该免疫组织化学试剂盒允许使用光学和电子显微镜对组织切片和培养的细胞中的细胞内癌蛋白进行定位。其可用于研究和临床用途。例如,对肿瘤进行活检或收集,并且使用切片机进行组织切片以检查细胞内癌蛋白产生的位点。该信息可在癌症的检测和治疗中用于诊断和可能的治疗用途。

[0355] 药物组合物

[0356] 抗细胞内癌蛋白抗体和细胞内癌蛋白疫苗可有效治疗癌症相关疾病。

[0357] 我们公开了使用本文所述的有效量的抗细胞内癌蛋白抗体治疗癌症相关疾病的方法。我们进一步公开了通过使用细胞内癌蛋白作为疫苗接种来预防癌症相关疾病的方法。

[0358] 可使用本领域普通技术人员已知的配制方法,使抗细胞内癌蛋白抗体或用作疫苗

的细胞内癌蛋白作为药用组合中分离和基本纯化的蛋白和蛋白片段提供。

[0359] 抗细胞内癌蛋白抗体或细胞内癌蛋白疫苗可以以药物组合物的形式给予。这样的药物组合物可包括治疗有效量的抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗,以及合适的赋形剂,稀释剂或载体。

[0360] 抗细胞内癌蛋白抗体和/或细胞内癌蛋白疫苗可特别引入到患者的血液循环中,例如通过静脉注入患者体内。

[0361] 适合肠道外给予的制剂包括水性和非水性无菌注射液,其可包含抗氧化剂,缓冲液,抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;和可包括助悬剂和增稠剂的水性和非水性无菌混悬剂。制剂可存在于单剂量或多剂量容器例如密封安瓿和小瓶中,并可储存在冷冻干燥(冻干)的条件下,在使用前仅需要加入无菌液态载体例如注射用水即可使用。可由先前所述的无菌粉末,颗粒和片剂临时制备注射液和混悬剂。

[0362] 可通过标准途径给予这些组合物。其包括但不限于:口服,经直肠,经眼内(包括玻璃体内或前房内),经鼻,局部(包括含服和舌下),子宫内,阴道内或胃肠道外(包括皮下,腹腔内,肌内,静脉内,皮内,颅内,气管内和硬膜外),透皮,腹腔内,颅内,脑室内,大脑内,叶鞘内,子宫内,或胃肠道外(例如,静脉内,脊柱内,皮下或肌内)途径。

[0363] 抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗制剂可方便地以单位剂型存在并可由传统制药技术制备。这样的技术包括使活性成分和药物载体或赋形剂联合的步骤。通常,均匀并直接地将活性成分与液态载体或研细的固态载体或两者联合以制备制剂,然后如有必要,对产品进行成型。

[0364] 此外,抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗可纳入可生物降解的聚合物中使得持续释放化合物,其中将聚合物植入需要药物递送的邻近处例如肿瘤位点,或植入以使抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗缓慢地全身性释放。在例如Brem等人(1.Neurosurg 1991 74:441-446)中对生物可降解聚合物及其应用进行了详细描述。微型渗透泵也可用于通过导管将高浓度的抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗的控制性递送至所关注的位点,如直接递送至转移性肿瘤或该肿瘤的血管供应中。

[0365] 抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗可连接于细胞毒药剂并以能够使递送最大化的方式输注至所需部位。例如,通过导管将连接蓖麻毒素的高亲和力抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗递送至供应靶位点的血管中或直接递送至靶点。也可通过偶联于输注导管的渗透泵以可控方式递送这样的药物。

[0366] 优选的单位剂型为含有如上所述的所给予成分的每日剂量或单位,每日亚剂量,或其合适部分。应当理解,除了成分特别是上述成分外,本文所述的制剂还可根据所考虑的制剂类型包括其它本领域的传统药剂。

[0367] 可以以任何合适方式给予抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物。通常为肠道外给予,例如在标准无菌无热原的稀释剂和载体的制剂中静脉或腹腔内给予,例如等渗盐水(当静脉内给予时)。一旦抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物与靶细胞结合并通常需要一天左右从血流中清除(如果必要)时,通常以单次输注剂量给予前药或对肿瘤进行成像。如果需要,由于抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物可以是免疫原性的,因此可给予环孢素或一些其它免疫抑制剂以提供更长的治疗时间,但通常不需要。

[0368] 本文所述的抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗的剂量将取决于疾病状态或所治疗的病症和其它临床因素,如人或动物的体重和病情以及化合物的给予途径。

[0369] 根据抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗在特定动物或人类中的半衰期,抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗的给予可为每日数次至每周一次。应当理解,本文所述方法和组合物可应用于人用和兽用用途中。本文所述的方法考虑单次以及多次给予,同时或经过较长时期后给予。

[0370] 由于结合物的肿瘤/正常组织比例(至少在静脉内给予后)在约4-6天时最高,而在该时间结合于肿瘤的结合物的绝对量以每克注射剂量百分比计低于较早的时间,因此可以以常规方式优化给予抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物和前药之间的时间。

[0371] 因此,给予抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物和前药之间的最佳间隔将是酶的峰肿瘤浓度和肿瘤与正常组织间最佳分配系数之间的折衷。医师可根据普通标准来选择抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物的剂量。至少在采用靶向性酶如 β -葡萄糖苷酶和静注苦杏仁苷作为毒性前药的方法的情况下,0.1至10.0克/平方米体表面积的日常剂量,优选1.0-5.0g/m²,持续1至50天是合适的。对于口服治疗,每日三次0.05至10.0g,优选1.0-5.0g的剂量,持续一至五十天可以是合适的。抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物的剂量类似地可根据正常标准选择,特别是参照肿瘤的类型,阶段和部位以及患者的体重来选择。治疗的持续时间部分取决于任何对抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗结合物的免疫反应的速度和程度。

[0372] 疾病

[0373] 本文所述的抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗(例如为药物组合物的形式)可用于治疗癌症。

[0374] 对于本文的目的,术语“癌症”可包括任意一种或多种如下疾病:急性淋巴细胞性白血病(ALL),急性髓细胞性白血病(AML),肾上腺皮质癌,肛门癌,膀胱癌,血癌,骨癌,脑瘤,乳腺癌,女性生殖系统癌,男性生殖系统癌,中枢神经系统淋巴瘤,宫颈癌,儿童横纹肌肉瘤,儿童肉瘤,慢性淋巴细胞性白血病(CLL),慢性髓细胞性白血病(CML),结肠和直肠癌,结肠癌,子宫内膜癌,子宫内膜肉瘤,食道癌,眼癌,胆囊癌,胃癌,胃肠道癌,毛细细胞白血病,头颈癌,肝细胞癌,霍奇金氏病,下咽癌,卡波西肉瘤,肾癌,喉癌,白血病,白血病,肝癌,肺癌,恶性纤维组织细胞瘤,恶性胸腺瘤,黑色素瘤,间皮瘤,多发性骨髓瘤,骨髓瘤,鼻腔及副鼻窦癌,鼻咽癌,神经系统癌,神经母细胞瘤,非霍奇金氏淋巴瘤,口腔癌,口咽癌,骨肉瘤,卵巢癌,胰腺癌,甲状旁腺癌,阴茎癌,咽癌,垂体瘤,浆细胞瘤,原发性CNS淋巴瘤,前列腺癌,直肠癌,呼吸系统,视网膜母细胞瘤,唾液腺癌,皮肤癌,小肠癌,软组织肉瘤,胃癌,胃癌,睾丸癌,甲状腺癌,泌尿系统癌,子宫肉瘤,阴道癌,血管系统,沃尔登斯特伦式巨球蛋白血症和维尔姆斯瘤。

[0375] 本文所述的抗细胞内癌蛋白抗体和/细胞内癌蛋白疫苗(例如为药物组合物的形式)可用于治疗癌症相关疾病。

[0376] 该疾病包括但不限于:实体瘤;血液肿瘤如白血病;肿瘤转移;良性肿瘤,例如血管瘤,听神经瘤,神经纤维瘤,沙眼,和化脓性肉芽肿;类风湿性关节炎;银屑病;眼部血管疾病,例如糖尿病性视网膜病变,早产儿视网膜病变,黄斑变性,角膜移植排斥反应,新生血管

性青光眼,晶体后纤维增生症,虹膜发红;Osier-Webber综合征;心肌血管生成;斑块新血管生成;毛细管扩张;血友病关节;血管纤维瘤;创面肉芽;冠状动脉侧枝;脑侧枝动静脉畸形;缺血肢体血管生成;新生血管性青光眼;晶体后纤维增生症;糖尿病性新血管生成;缠绕杆菌属相关疾病,骨折,血管发生,造血,排卵,月经和胎盘形成。

[0377] 实施例

[0378] 我们的结果表明当肿瘤特异性抗原激发时,可刺激宿主免疫产生针对特异性抗原的内源性抗体从而引起肿瘤抑制。“癌症疫苗”这一概念一直是有希望但具有挑战的机会²¹。重要的是,我们发现与外源性递送抗体相比,抗原诱导的抗体疗法可达到类似的抗肿瘤疗效。除了更加经济以外,由于我们天生具有巨大的潜在适应性以自身产生高效价的抗原诱导的抗肿瘤抗体,因此我们相信前一种方法比后者更加有用。虽然使用“癌蛋白”接种似乎不是现实的想法,但我们坚信该方法值得在未来研究。“癌蛋白”应正确位于其天然的亚细胞位置,与其相邻伴侣正确联系以在癌细胞信号网络中保持致癌作用。当“癌蛋白”与其亚细胞位置的天然动态复合物分离时,其会失去联系并无法在该“分离”情况下进行其正常生物学作用。

[0379] 我们的体内数据显示了免疫疗法不仅可靶向细胞外癌蛋白而且可靶向细胞内癌蛋白以发挥抗癌活性这一迄今未认可的现象。

[0380] 实施例E1部分(实施例1至18).使用抗体疗法或接种来靶向细胞内癌蛋白的概念验证

[0381] E1部分包括实施例1至18。实施例1为对E1部分的介绍,实施例2至10为用于E1部分的材料和方法,实施例11至16为E1部分的结果,实施例17为E1部分的讨论,实施例18为E1部分的参考文献。

[0382] 实施例1.介绍(E1部分)

[0383] 已证明单克隆抗体(mAb)是针对某些人类最致命疾病的强大及高特异性的药物¹。为了利用抗体特异性结合于生物靶点的能力,大量的研发聚焦于开发针对细胞外/细胞表面致癌靶点的单克隆抗体。该分子靶向的癌症治疗成功的第一波是FDA分别批准抗血管内皮生长因子抗体贝伐单抗(Avastin)和抗HER2/neu抗体曲妥单抗(Herceptin)用于治疗结肠直肠癌和乳腺癌²。这些为传统抗细胞外蛋白的抗体的实例。不幸的是,大多数细胞蛋白在细胞内,并且由于普遍认为抗体无法到达细胞内部位,因此仍然未研究出抗体治疗方法³。然而,自1978年以来的大量实验结果和临床观察表明并非如此,免疫学家已表明自身抗体穿透至活细胞是常见的细胞现象^{4,5}。

[0384] 为了证实可能的针对细胞内靶点的免疫疗法的概念,我们在该研究中选择了三种用于治疗癌症的细胞内靶点,即肝再生磷酸酶3(PRL-3),增强绿色荧光蛋白(EGFP),和多瘤病毒中T(mt)癌蛋白。PRL-3是1994和1998年确定的三个PRL磷酸酶之一^{6,7},并且PRL-1,PRL-2和PRL-3构成蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)家族的亚组⁸。PRL为细胞内C端异戊烯化的磷酸酶^{9,10},并且通过EM免疫金标记可显示PRL-1和PRL-3在质膜内叶和早期核内体中的定位¹¹。PRL磷酸酶代表可在人类癌症中用作生物标志物和治疗靶点的一组有趣蛋白。在2001年,使用基因表达序列分析(SAGE)技术,通过比较转移性结肠直肠癌和原发癌、良性结肠直肠肿瘤,和正常结肠直肠上皮的全局基因表达谱,首次发现PRL-3 mRNA水平的上调与结肠直肠癌转移密切相关¹²。也报导了PRL-3蛋白水平在平均22.3%的癌症样本中升高(n=1008)¹³。此

外,报导了当与其正常对应物相比时,个体PRL的上调与多种类型的晚期人类转移性癌症相关¹⁴。因此,本研究选择致癌PRL-3作为理想的细胞内靶点。

[0385] 其次,为了探索抗体疗法是否能够广泛应用于其它细胞内蛋白,我们选择了胞浆增强型绿色荧光蛋白(EGFP),其为最初分离自水母Aequorea Victoria的普遍报导的蛋白。EGFP通过核质定位模式将自身表达为细胞内蛋白。由于EGFP不在宿主组织中表达,所以当人为地在癌细胞中过表达时,EGFP可充当癌细胞的特异性细胞内蛋白。这允许我们检查针对EGFP的抗体疗法是否可特异性消除表达EGFP的肿瘤并显示任何对宿主的非特异性不良副作用。

[0386] 最后,为了在另一个动物肿瘤模型中测试抗体疗法的原理,我们使用了众所周知的MMTV-PyMT转基因小鼠的乳腺癌模型¹⁵,其在小鼠乳腺肿瘤病毒启动子/增强子的转录控制下携带中T(mT)致癌基因。数十年来,癌症研究委员会一直将这样的转基因小鼠广泛用作极好的自发肿瘤模型,以评估转移性乳腺肿瘤表型的相对贡献^{16,17}。

[0387] 疫苗价格便宜,并且可有效治疗现有的癌症或预防癌症发展¹⁸。这种对癌症的特异性主动免疫治疗如果能够成功,将比被动免疫治疗具有明显的优势。如果抗体能够识别其细胞内抗原,则我们可预期细胞内抗原能够用于触发宿主免疫系统产生天然抗体而达到与抗癌的抗体疗法相似的效果。在本文中,我们将研究扩展至评价在抗原诱导的抗体疗法中,使用纯化的PRL-3,EGFP和mT蛋白接种的可靠性。

[0388] 实施例2.材料和方法(E1部分):细胞系和细胞培养

[0389] B16F0(CRL-6322)和B16F10(CRL-6475)小鼠黑色素瘤细胞系(来自C57BL/6J品系)购自American Type Culture Collection(ATCC,Manassas,VA)。在补充了10%胎牛血清和抗生素的RPMI培养基中培养细胞,并保持在供给5%CO₂的37°C孵化器中。

[0390] 实施例3.材料和方法(E1部分):蛋白质印迹分析

[0391] 详细步骤描述在我们先前的研究中²²。

[0392] 实施例4.材料和方法(E1部分):抗体

[0393] 如前所述,内部制备小鼠单克隆抗体(克隆#318,IgG1)²²。EGFP小鼠单克隆抗体(sc-9996,IgG2a)和多瘤病毒中T抗原(PyMT)大鼠单克隆抗体(sc-53481,IgG2b)来自Santa Cruz biotechnology,Inc。

[0394] 实施例5.材料和方法(E1部分):GST-PRL-3,GST-中T质粒的构建,以及GST-融合蛋白的制备

[0395] 用于生成GST-PRL-3融合蛋白的详细步骤如前所述²²。为了制备GST-中T:正向引物5' g c g g a t c c a t g g a t a g a g t t c t g a g c a g a g c t g a c 3' 和反向引物5' c t g a a t t c c t a g a a t g c c g g a a c g 3'用于PCR,使用pXJ40载体(即pXJ40-PyMT)作为模板。使用BamH1和EcoR1消化PCR片段并连接于pGEX-KG载体的各自位点。之前详细描述了GST-融合蛋白的制备²²。

[0396] 实施例6.材料和方法(E1部分):实验性转移分析²³

[0397] 所有动物实验均由机构动物管理及使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)(IACUC)批准并根据新加坡分子与细胞生物研究院伦理委员会(Institute of Molecular and Cell Biology's Review Board)(IRB)的政策进行¹⁸。C57BL6和Scid小鼠来自BRC(Biological Resources Centre(生物资源中心),Agency for

Science, technology and Research, 新加坡), muMT小鼠来自Jackson Laboratory, 美国, Rag 2^{-/-}小鼠来自Taconic, 美国, Rag 2^{-/-}小鼠来自Taconic, 美国。通过尾静脉向8周龄小鼠注射百万个癌细胞(第1天)。第3天通过尾静脉将mAb给予接受治疗的小鼠, 之后每周给予两次。将4周龄的转基因小鼠分为两组, 分别接受抗mT抗体或PBS, 每周两次。处死小鼠并检查所有器官上宏观转移的存在。取出转移的肿瘤或器官, 并固定在4%多聚甲醛中以进行组织学分析。在解剖显微镜下对肺转移结节进行计数。每个实验中用于抗体治疗的小鼠数量总结在图5G中。

[0398] 实施例7. 材料和方法(E1部分): MMTV-PyMT小鼠的基因分型

[0399] MMTV-PyMT小鼠品系购自人类癌症小鼠模型联盟(Mouse Models of Human Cancers Consortium)(MMHCC)。雌性不能泌乳所以通过使杂合(Tg/+)雄性和FVB/N(+/+)野生型雌性交配来维持该品系。使用DNA消化缓冲液(12ml:10.08ml, 1.2ml的10x GB*缓冲液, 0.6ml的10%Triton X-100, 0.12ml的2-巯基乙醇)提取尾尖DNA。*Gitschier缓冲液(10ml: 3.35ml的2M Tris pH 8.8, 1.66ml的1M (NH₄)₂SO₄, 1.34ml的0.5M MgCl₂, 1.65ml MQ H₂O)。正向引物P001: 5'-cAA ATG TTG cTT GTcTGG TG-3'和反向引物P002: 5'-GTc AGT cGA GTG cAc AGT TT-3'用于PCR野生型200bp片段。正向引物P001: 5'-GGA AGc AAG TAc TTc AcAAGG G-3'和反向引物P004: 5'-GGA AAG TcA cTA GGA GcA GGG-3'用于PCR 566bp转基因片段。基因分型程序如前所述(<http://mouse.ncicrf.gov/protocols>)。

[0400] 实施例8. 材料和方法(E1部分): 整装制片和胭脂红明矾染色

[0401] 如下所有步骤均在室温下进行。在验尸过程中切除腹部乳腺以整装制片, 铺在载玻片上, 并且在卡诺依氏固定液(6份100%乙醇, 3份氯仿, 和1份冰醋酸)中固定4h。然后在70%乙醇中洗涤组织15min, 并将乙醇逐渐更换为蒸馏水, 最后在蒸馏水中漂洗5min。在胭脂红明矾染料中进行染色过夜。然后在梯度乙醇溶液中对组织进行脱水(70, 95, 和100%; 每个15min)并通过两次更换二甲苯而透明化, 固定, 并使用Permount封上盖玻片。在Leica解剖显微镜(Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, 德国)下观察全标本, 并使用SPOTFLEX®彩色数码相机(Diagnostic Instruments, Inc. Sterling Heights, MI)和SPOT软件包(Version 4.5, Diagnostic Instruments, Inc. Sterling Heights, MI)记录数字图像。

[0402] 实施例9. 材料和方法(E1部分): C57BL6小鼠和MMTV-PyMT转基因小鼠的免疫

[0403] 弗氏完全佐剂是含有乳酪分支杆菌的死细胞以提高免疫应答的形式。完全佐剂用于初始注射。未包含该细菌的类型称为弗氏不完全佐剂, 其用于在后续注射中加强。使用总体积为200μl的弗氏佐剂通过腹腔注射使8周龄的C57BL6小鼠免疫: 将100μl盐水中的PRL-3 (20μg)或EGFP (20μg)与100μl完全佐剂(Cat#77140, Pierce)混合。使用总体积为200μl的弗氏佐剂通过腹腔注射使4周龄的MMTV-PyMT TG小鼠免疫: 将100μl盐水中的mT (10μg)抗原与100μl完全佐剂(Cat#77140, Pierce)混合。使用总体积为200μl的不完全佐剂(Cat#77145, Pierce)进行之后的两次免疫。第二次和第三次注射间隔两周。随后, 在涂覆肝素的毛细管中收集100-200μl的尾血, 使用血液样本制备血浆, 并通过ELISA测量抗体效价。ELISA的详细步骤如前所述²²。选择血清中具有高效价的PRL-3, EGFP, 或mT抗体的小鼠进行实验和进一步分析。用于接种的小鼠数量总结于图6D中。

[0404] 实施例10. 材料和方法(E1部分): ELISA分析

[0405] 在pH为7.4的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲溶液中制备PRL-3和mT抗原储备液。将含有

50ng合适抗原的100 μ l溶液加至96孔板并在4 $^{\circ}$ C下孵化过夜以使抗原包被于板上。37 $^{\circ}$ C下使用含有0.05%吐温20的PBS中的3%BSA封闭板1小时并使用PBS洗涤三次。使用100 μ l封闭液稀释来自各小鼠的血清(1.0 μ l)并加至每孔中,然后在37 $^{\circ}$ C下孵化2小时。以1:5000稀释于PBS中的100 μ l合适的结合了HRP(Pierce,美国)的第二抗体加入至每个孔中,并在37 $^{\circ}$ C下孵化1小时。使用含有0.05%吐温20的PBS漂洗板三次,接着用无菌水洗涤3次。将底物,100 μ l的Turbo-TMBTM(Pierce,美国)加入至每个孔中并在室温下孵化10min。通过加入100 μ l浓H₂SO₄终止反应。使用Dynatech MR7000酶标仪(Dynatech,美国)在450nm下测量吸光度。

[0406] 实施例11.材料和方法(E1部分):统计分析

[0407] 使用Kaplan-Meier法估算“治疗”与“未治疗”小鼠的累积生存率。 <0.05 的p值被认为是统计学上显著的。

[0408] 实施例12.结果(E1部分):在C57BL6野生型小鼠中,PRL-3mAb(IgG1)有效延迟表达内源性PRL-3蛋白的转移性肿瘤

[0409] 我们之前已证实在免疫系统损伤的裸鼠转移性肿瘤模型中针对细胞内PRL蛋白的抗体疗法的效果¹⁹。为了在未来临床应用更相关的模型中检查该治疗方法,我们将该研究扩展至检查抗体治疗是否可作用于具有免疫活性的C57BL6野生型小鼠。第1天,通过外侧尾静脉向小鼠(8周龄)静脉(i.v.)注射C57BL6-衍生的B16F0(F0)黑色素瘤细胞,其表达内源性PRL-3(图1A,第1道)。第3天,将小鼠分为“未治疗”和“治疗”组,在试验的整个持续过程中每周分别接受两次PBS或PRL-3 mAb的给予(图1B)。在实验末(第17天)，“未治疗”的小鼠显示体重严重减轻,在各器官(包括肺,肝,肾上腺,肾脏和骨骼)上有多个转移性肿瘤。相反,“治疗”的小鼠看起来更加活跃和健康。“治疗”小鼠组而不是“未治疗”组在实验的整个持续过程中体重持续增加,与肿瘤转移的减少一致(图1C-1D)。为了证实PRL-3 mAb的特异性,平行进行相同实验,其中对小鼠静脉注射C57BL6-衍生的B16F10(F10)细胞,其为另一种黑色素瘤细胞系,其表达极低水平的PRL-3(图1A,第2道)。实验末期(第17天),不论是否接受了PRL-3 mAb,所有F10受体均在卵巢,肾上腺,肾脏和骨骼上形成肿瘤。两组小鼠均经历明显的体重减轻并变得虚弱/不活跃(图1E-F),表明不表达PRL-3的F10受体对PRL-3抗体治疗具有较差的应答。注意到与F0受体的肺(图1C)相比,F10受体在肺部形成侵略性更强的转移性肿瘤(图1E)。这些数据表明PRL-3抗体治疗的疗效与癌细胞的PRL-3表达状态紧密相关,但不与转移活性的程度相关。因此来自免疫活性野生型C57BL6小鼠的新近资料证实了我们之前在免疫受损的裸鼠中的结果¹⁹。

[0410] 实施例13.结果(E1部分):在B细胞缺陷的小鼠中,PRL-3 mAb(IgG1)未能延迟表达内源性PRL-3蛋白的转移性肿瘤

[0411] 为了研究淋巴细胞是否参与所观察到的抗体治疗作用,我们采用两个基因工程的免疫缺陷小鼠品系:muMT小鼠,其为mu链基因的膜外显子失活突变的C57BL6小鼠纯合子。它们不能形成前BCR因此缺乏成熟的B淋巴细胞。我们也采用携带胚系突变的Rag-2小鼠,其中大部分编码RAG-2的区域缺失,因此引起纯合子突变(Rag2^{-/-}),其可存活但无法产生成熟B或T淋巴细胞²¹。Kaplan-Meier生存曲线用于比较muMT-F0,C57BL6-F0,C57BL6-F10小鼠中的“治疗”和“未治疗”小鼠。

[0412] 令人惊讶的是,我们未观察到PRL-3 mAb抑制muMT-F0小鼠肿瘤的任何疗效,PRL-3 mAb疗法对muMT-F0小鼠寿命的延长无影响,“治疗”小鼠的中位生存时间为19天,“未治疗”

小鼠为18.5天(图2A, p 值=0.8661)。类似地,在缺乏B-和T-细胞的Rag2-F0小鼠的“治疗”和“未治疗”组之间未观察到肿瘤转移的差异(数据未示出)。相反,PRL-3 mAb治疗可延长C57BL6-F0小鼠的存活率,其中“治疗”小鼠的中位生存时间为21.5天,而“未治疗”小鼠为17天(图2B, $p=0.0002$)。与之前的结果一致,PRL-3 mAb治疗未延长具有不表达PRL-3的肿瘤的C57BL6-F10小鼠的总生存时间,其中“治疗”小鼠的中位生存时间为17.5天,而“未治疗”小鼠为16.5天(图2C, $p=0.535$)。为了总结不同小鼠背景中抗体治疗的效果,我们对PRL-3 mAb相对于每组中未治疗小鼠降低转移性肿瘤形成的程度的能力进行评分。当转移性肿瘤形成降低至少70%($\pm 10\%$)时评为有效结果,仅在C57BL6-F0组而并非muMT-F0组中观察到明显有益的效果(图2D)。因此,PRL-3抗体治疗可能需要成熟B-细胞作用以用于抗肿瘤活性。

[0413] 实施例14. 结果(E1部分):在C57BL6小鼠中,EGFP mAb(IgG2a)有效阻断表达EGFP蛋白的转移性肿瘤

[0414] PRL-3 mAb抑制肿瘤转移的有趣能力促使我们研究治疗策略是否也可应用于其它细胞内蛋白。由于EGFP是非癌症相关蛋白,所以我们选择将EGFP用作在癌细胞中特异表达的细胞内蛋白标志物。由于EGFP不在宿主组织中表达,所以我们预测EGFP抗体在动物模型中应具有很低的不良副作用。利用异质性过表达外源EGFP蛋白的混合的F0和F10黑色素瘤细胞系(图5A,图5B),将表达EGFP-F0和EGFP-F10的细胞注入,并根据相同治疗日程使用EGFP mAb进行治疗(图5C)。据预测,不论是否表达PRL-3,EGFP-F0和EGFP-F10细胞在肿瘤消退方面对EGFP抗体治疗的响应相同。值得注意的是,在肺部发现离散的绿色荧光集群或黑色的转移性肿瘤(图5D-E,画面a,e)。不表达EGFP的转移为黑色,因此可充当该模型中绿色转移性肿瘤的内部阴性对照。显著地,EGFP mAb可特异性降低EGFP转移的数量但不降低非EGFP转移的数量(图5D-E,画面e),表明仅有表达EGFP的肿瘤响应EGFP mAb治疗。当根据转移性肿瘤负荷的降低对结果评分后,我们发现EGFP mAb作用的疗效与癌细胞中EGFP的表达状态密切相关(图5G)。因此,抗体疗法的疗效取决于细胞上(或内部)特异性抗体-抗原的相互作用。

[0415] 实施例15. 结果(E1部分):在MMTV-PyMT转基因小鼠中,mT(大鼠IgG2b)mAb防止表达mT的进行性乳腺肿瘤的形成

[0416] 已确定抗体疗法可对抗内源性(如PRL-3)和外源性(如EGFP)细胞内蛋白,我们想知道该方法是否可在自发肿瘤动物模型中抑制肿瘤形成。为此,我们选择常见的自发发生乳腺肿瘤的MMTV-PyMT转基因小鼠模型。MMTV-PyMT转基因小鼠表达多瘤病毒中T(mT)致癌蛋白,其为包含421个氨基酸的DNA病毒蛋白,其在乳腺上皮细胞中充当较强的致癌基因。mT表示为线性的,其羧基末端连接于(21aa)膜,具有可能暴露于细胞表面的短KRSRHF模体(通常太短而不能成为外部表位)。因此,大多数蛋白朝向细胞质隔室,从而被认作细胞内蛋白¹⁵。表达mT的细胞的转移性潜力升高¹⁶。所有雌性携带者(基因型+/-)在2-3月龄时形成可触及的乳腺肿瘤(腺癌)(http://mouse.ncifcrf.gov/information/order_livemice.asp)。在雄性和雌性乳腺中检测到高水平的中T表达,并且mT致癌基因的表达足以使乳腺上皮细胞转化。我们使用44个杂合的(+/-)幼龄转基因雌性,使用RT-PCR确定其基因型(图3A)并将它们分为“治疗”(n=18)和“未治疗”(n=26)组。为测定mT抗体是否能够降低表达mT乳腺肿瘤的发展,给4周龄的“治疗”小鼠i.v.注射mT抗体,接着在整个试验约3个月的持续过程中每周两次给予抗体(图3B)。在图3C中,“未治疗”小鼠(#2,#6)和“治疗”小鼠(#

7, #10) 选作代表性实例; FVB/N 非转基因雌性 (#3) 用作乳腺正常尺寸的对照 (5 对)。对“未治疗”小鼠的乳腺病理学检查显示不规则形成侧枝, 增大的末端乳芽, 和某些较大的多小叶肿瘤细胞团 (图 3D, a)。相反, 与来自野生型小鼠的正常乳腺相比, 来自治疗小鼠的乳腺组织显示更加正常的生长和发展 (图 3D, b-c)。使用 Kaplan-Meier 方法估算“治疗”与“未治疗”MMTV-PyMT 转基因小鼠的累积存活率, 我们发现 mTAb 治疗可延长治疗小鼠的寿命, 使“治疗”MMTV-PyMT 小鼠的中位生存时间与未治疗小鼠的 15 周相比升高至 19.5 周 (图 3E, $p=0.0018$)。总之, 我们发现 100% (26/26) 的“未治疗”小鼠携带严重的乳腺肿瘤, 而仅 16.6% (3/18) 的 mT 抗体治疗的小鼠形成携带肿瘤的乳腺, 其中其余显示表达 mT 致癌基因的转移性肿瘤的形成显著下降 (图 3F 和图 5F)。这些结果表明仅使用 mT 抗体治疗 MMTV-PyMT 小鼠可广泛抑制自发肿瘤形成。

[0417] 实施例 16. 结果 (E1 部分): 接种 PRL-3 蛋白或 EGFP 的 C57BL6 小鼠可抵抗表达 PRL-3 或 EGFP 的肿瘤的形成

[0418] 成功说明了如何使用其各自抗体靶向三种不同的细胞内蛋白 (PRL-3, EGFP, 和 mT), 接下来我们想知道抗原激发 (接种) 后免疫应答所产生的天然抗体是否能靶向细胞内蛋白。我们使用三个剂量 (每个 20 μg) 的 PRL-3 抗原 ($n=16$) 或 EGFP 蛋白 ($n=14$) 以 2 周的时间间隔对 8 周龄 C57BL6 小鼠进行免疫 (图 6A)。在免疫末期, 通过 ELISA 测试 14 周龄的已免疫 C57BL6 小鼠血清的抗 PRL-3 抗原或 EGFP 蛋白的抗体效价 (数据未示出)。随后将成功免疫的小鼠分为两组, i.v. 注射 EGFP-F0 (PRL-3 阳性) 或 EGFP-F10 (PRL-3 阴性) 黑色素瘤细胞。与未免疫的小鼠相比 ($n=18$) (图 6B, a-d), PRL-3 免疫的小鼠显示肾上腺, 卵巢和肺中由 EGFP-F0 形成的转移性肿瘤减少 (图 6B, e-g)。据预计, 由于 EGFP-F0 黑色素瘤细胞表达 EGFP 和 PRL-3 蛋白, 因此应响应 EGFP 和 PRL-3 抗体治疗。值得注意的是, 与未免疫小鼠的肺转移相比 (图 6B, d), PRL-3 免疫的小鼠不能降低由不表达 PRL-3 蛋白的 EGFP-F10 黑色素瘤细胞 (图 5A) 形成的转移性肺肿瘤的侵略性的程度 (图 6B, h)。此外, 这表明抗原诱导的, 天然产生的 PRL-3 抗体对不表达 PRL-3 的 EGFP-F10 肿瘤的抑制无影响。我们巧妙地表明无论 PRL-3 的表达水平多高, GFP 免疫均能够降低肾上腺、卵巢和肺中由 EGFP-F0 和 EGFP-F10 癌细胞形成的转移性肿瘤 (图 6B, i-l)。总之, 这些结果表明接种后在宿主免疫系统中抗 PRL-3 或抗 EGFP 抗体的诱导可分别特异性抑制表达 PRL-3 或 EGFP 的肿瘤的形成。

[0419] 实施例 17. 结果 (E1 部分): 接种 mT 抗原的 MMTV-PyMT 转基因幼龄雌性防止乳腺 mT 肿瘤的形成

[0420] 为了进一步证实使用细胞内蛋白接种癌症的可能性, 我们再次采用 MMTV-PyMT 转基因乳腺肿瘤模型。将 38 只 FVB/N 杂合雌性 (4 周龄) 分为 GST-免疫组 ($n=3$), GST-mT-免疫组 ($n=17$), 和未免疫对照组 ($n=18$)。分别使用三个剂量 (每个 10 μg) 的 GST 或 GST-mT 抗原以 2 周的时间间隔对小鼠进行免疫 (图 4A)。通过 ELISA 检查该小鼠的 mT 抗体效价以确定其血液循环中存在 mT 抗体 (参见图 4B 中代表性实例)。值得注意的是, 与 GST 免疫的小鼠 (#43, #44, #45) 相比, mT 免疫的小鼠 (#37, #40, #41) 显示乳腺肿瘤的尺寸和重量的急剧下降 (图 4C-D), 其中来自 GST 免疫的, GST-mT 免疫的, 和野生型对照小鼠的乳腺组织平均重量/小鼠分别为 5.6g, 1.3g, 和 0.6g (图 4D)。接种实验的结果总结在图 6C-D 中。Kaplan-Meier 存活曲线表明与未免疫组 (14.5 周) 相比, mT 抗原可延长免疫小鼠 (19.5 周) 的平均存活率 ($p=0.0004$) (图 4E), 这表明癌症接种对显著延长生存时间具有积极效应。总之, 数据表明抗原诱导的宿主

mT抗体仍可有效防止由表达mT的癌细胞形成的自发乳腺肿瘤。

[0421] 实施例18.讨论(E1部分)

[0422] 尽管细胞外蛋白靶向取得了进步,但在抗体治疗方面却很少关注细胞内蛋白靶向。我们在本文所述的研究中记录了独特的概念验证,其中针对细胞内蛋白的抗癌抗体治疗可显著降低体内的肿瘤进展。

[0423] 这里,我们表明抗两种细胞内蛋白(PRL-3和EGFP)的抗体治疗在对抗野生型C57BL6小鼠的鼠黑色素瘤转移中的功效。在MMTV-PyMT转基因小鼠自发肿瘤模型中对抗细胞内mT抗原也获得了类似成功。由于IgG 1(PRL-3 mAb),IgG2a(EGFP mAb),IgG2b(PyMT大鼠mAb),和自生成抗体可有效抑制肿瘤进展,因此所观察到的治疗反应似乎具有同型依赖性。合适的抗体-抗原相互作用似乎为主导因素;使用不相关的抗体靶向肿瘤未产生任何有益应答。有趣的是,我们也发现成熟B细胞是抗体治疗应答的重要组成部分。这些结果与最近的报导相似,其中发现B细胞为对抗结肠腺癌的抗DR5抗体治疗所必需的²³。

[0424] 我们的结果也表明肿瘤特异性抗原激发后,可刺激宿主免疫产生对抗特异性抗原的内源性抗体,从而引起肿瘤抑制。“癌症疫苗”这一概念一直是有希望但具有挑战的机会¹⁹。重要的是,我们发现与外源性给予抗体相比,抗原诱导的抗体疗法可达到类似的抗肿瘤疗效。由于我们天生具有巨大的潜在适应性以自身产生高效价的抗原诱导的抗肿瘤抗体,因此我们相信其更加有用并且经济。虽然使用“癌蛋白”接种似乎不是现实的想法,但我们坚信该方法值得在未来研究。为了在癌细胞信号网络中保持致癌作用,“癌蛋白”应正确位于其天然的亚细胞位置,与其相邻伴侣正确联系。当“癌蛋白”与其亚细胞位置的天然动态复合物分离时,其会失去联系并无法进行其正常生物学作用。

[0425] 本文所述的工作描述了用于未来临床癌症治疗的可能方法。首先,切除原发肿瘤并检查以确定肿瘤特异性抗原。接着引入针对肿瘤抗原的特异性嵌合抗体或人源化抗体以消除散布的细胞,从而抑制微转移的形成²⁴。该步骤可很好地防止癌症患者的进一步扩散或复发。另外,对于遗传易感的癌症,使用与家族性癌症相关的抗原对免疫活性的年轻易感的家庭成员进行免疫可使免疫系统发生针对该癌蛋白的“初免”。这些内源性刺激的抗体将长期存在并中和表达特定癌蛋白的癌细胞。我们将该方法建立在我们观察的基础上,其中将非常小量的mT抗原(10 μ g)引入幼龄MMTV-PyMT转基因小鼠中可活化宿主免疫系统并产生mT抗体以抑制表达mT的肿瘤的形成,使其无症状地存活可达4个月。小鼠寿命延长数周相当于人类延长数年。

[0426] 最后,本文所述的临床前数据表明通过使用靶向细胞外和细胞内肿瘤特异性抗原的外源性和内源性抗体治疗的癌症治疗的普遍应用。由于现有的传统临床抗体疗法较昂贵,我们主张研究人员进一步开发本文所研究的稳定的抗原诱导的抗体疗法应答。为了更强的治疗应答,我们认为该方法可与其它免疫刺激剂组合以达到最佳效果。随着癌症研究迅速走向个体化癌症治疗,我们的特异性靶向细胞内(或细胞外)癌蛋白的策略在未来的调整癌症治疗中具有巨大的前景。

[0427] 实施例19.参考文献(E1部分)

[0428] 1.K.Imai and A.Takaoka,Comparing Antibody and Small-Molecule Therapies for Cancer.Nat Rev Cancer.6(9),714-727(2006).

[0429] 2.J.Cohen and A.Wilson,New Challenges to Medicare Beneficiary Access

to mAbs.mAbs.1(1),56-66(2009).

[0430] 3.M.Baker,Upping the Ante on Antibodies.Nat Biotechnol.23(9),1065-1072(2005).

[0431] 4.A.Ruiz-Arguelles and D.Alarcon-Segovia, Penetration of Autoantibodies into Living Cells.lsr Med Assoc J.3(2),121-126(2001).

[0432] 5.D.Alarcon-Segovia,A.Ruiz-Arguelles and E.Fishbein,Antibody to Nuclear Ribonucleoprotein Penetrates Live Human Mononuclear Cells through Fc Receptors.Nature.271(5640),67-69(1978).

[0433] 6.R.H.Diamond,D.E.Cressman,T.M.Laz,C.S.Abrams and R.Taub,Prl-1,a Unique Nuclear Protein Tyrosine Phosphatase,Affects Cell Growth.Mol Cell Biol.14(6),3752-3762(1994).

[0434] 7.Q.Zeng,W.Hong and Y.H.Tan,Mouse Prl-2 and Prl-3,Two Potentially Prenylated Protein Tyrosine Phosphatases Homologous to Prl-1.Biochem Biophys Res Comm.244(2),421-427(1998).

[0435] 8.A.Alonso,J.Sasin,N.Bottini,I.Friedberg,I.Friedberg,A.Osterman,A.Godzik,T.Hunter,J.Dixon and T.Mustelin,Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome.Cell.117(6),699-711(2004).

[0436] 9.X.Si,Q.Zeng,C.H.Ng,W.Hong and C.J.Pallen,Interaction of Farnesylated Prl-2,a Protein-Tyrosine Phosphatase,with the Beta-Subunit of Geranylgeranyltransferase II.J BioChem.276(35),32875-32882(2001).

[0437] 10.J.Wang,C.E.Kirby and R.Herbst,The Tyrosine Phosphatase Prl-1 Localizes to the Endoplasmic Reticulum and the Mitotic Spindle and Is Required for Normal Mitosis.J Biol Chem.277(48),46659-46668(2002).

[0438] 11.Q.Zeng,X.Si,H.Horstmann,Y.Xu,W.Hong and C.J.Pallen,Prenylation-Dependent Association of Protein-Tyrosine Phosphatases Prl-1,-2,and-3 with the Plasma Membrane and the Early Endosome.J Biol Chem.275(28),21444-21452(2000).

[0439] 12.S.Saha,A.Barde Ili,P.Buckhaults,V.E.Velculescu,C.Rago,B.St Croix,K.E.Romans,M.A.Choti,C.Lengauer,K.W.Kinzler and B.Vogelstein,A Phosphatase Associated with Metastasis of Colorectal Cancer.Science.294(5545),1343-1346(2001).

[0440] 13.H.Wang,L.A.Vardy,C.P.Tan,J.M.Loo,K.Guo,J.Li,S.G.Lim,J.Zhou,W.J.Chng,S.B.Ng,H.X.Li and Q.Zeng,Pcbpl Suppresses the Translation of Metastasis-Associated Prl-3 Phosphatase.Cancer Cell.18(1),52-62(2010).

[0441] 14.J.A.Sager,S.Benvenuti and A.Bardelli,Prl-3:A Phosphatase for Metastasis?Cancer Biol Ther.3(10),952-953(2004).

[0442] 15.S.M.Dilworth,Polyoma Virus Middle T Antigen and Its Role in Identifying Cancer-Related Molecules.Nat Rev Cancer.2(12),951-956(2002).

[0443] 16.C.T.Guy,R.D.Cardiff and W.J.Muller,Induction of Mammary Tumors by

Expression of Polyomavirus Middle T Oncogene:A Transgenic Mouse Model for Metastatic Disease.Mol Cell Biol.12(3),954-961(1992).

[0444] 17.Y.Husemann,J.B.Geigl,F.Schubert,P.Musiani,M.Meyer,E.Burghart,G.Forni,R.Eils,T.Fehm,G.Riethmuller and C.A.Klein, Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer.Cancer Cell.13(1),58-68(2008).

[0445] 18.E.Gilboa, The Promise of Cancer Vaccines.Nat Rev Cancer.4(5),401-411(2004).

[0446] 19.K.Guo,J.P.Tang,C.P.B.Tan,H.Wang and Q.Zeng, Monoclonal Antibodies Target Intracellular Prl Phosphatases to Inhibit Cancer Metastases in Mice.Cancer Biol Ther.7(5),750-757(2008).

[0447] 20.T.von der Weid,N.Honarvar and J.Langhome, Gene-Targeted Mice Lacking B Cells Are Unable to Eliminate a Blood Stage Malaria Infection.J Immunol.156(7),2510-2516(1996).

[0448] 21.Y.Shinkai,G.Rathbun,K.P.Lam,E.M.Oltz,V.Stewar,M.Mendelsohn,J.Charron,M.Datta,F.Young and A.M.Stall, Rag-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement.Cell.68(5),855-867(1992).

[0449] 22.J.Li,K.Guo,V.W.C.Koh,J.P.Tang,B.Q.Gan,H.Shi,H.X.Li and Q.Zeng, Generation of Prl-3- and Prl-1-Specific Monoclonal Antibodies as Potential Diagnostic Markers for Cancer Metastases.Clin Cancer Res.11(6),2195-2204 (2005).

[0450] 23.Haynes NM,Hawkins ED,Li M,McLaughlin NM,Hämmerling GJ,Schwendener R, Winoto A,Wensky A,Yagita H,Takeda K,Kershaw MH,Darcy PK,Smyth MJ.CD11c+ dendritic cells and B cells contribute to the tumoricidal activity of anti-DR5 antibody therapy in established tumors.J Immunol.185(1):532-41(2010).

[0451] 24.B.Weigelt,J.L.Peterse and L.J.van't Veer, Breast Cancer Metastasis: Markers and Models.Nat Rev Cancer.5(8),591-602(2005).

[0452] 实施例E2部分(实施例20至38).在动物模型中宿主免疫对靶向细胞内PRL-3的嵌合抗体的抗癌疗效至关重要

[0453] E2部分包括实施例20至38。实施例20为E2部分的介绍,实施例21至29为E2部分的材料与方法,实施例30至36为E2部分的结果,实施例37为E2部分的讨论,实施例38为E2部分的参考文献。

[0454] 实施例20.介绍(E2部分)

[0455] 一个世纪前,德国化学家Paul Ehrlich提出了“魔法子弹”这一抗体概念。事实上,已证明单克隆抗体(mAb)是针对某些人类最致命疾病的自然界的生物弹头^{1,2}。通常,抗体靶向治疗比使用小分子抑制剂的化疗毒性更低。抗体被视为增长最为迅速的人类治疗种类,并且为通过免疫系统识别及破坏恶性肿瘤细胞的理想药物。然而,该治疗方法限于癌细胞表达的细胞表面或分泌蛋白^{3,4},部分由于抗体太大(150kDa)而无法穿过细胞膜的假设。因此,对于抗体疗法来说,一系列的细胞内癌蛋白仍然未开发。然而,完整抗体不能穿透至活细胞中

这一概念受到了大量实验结果和临床观察数据的挑战^{5,6,7}。在过去30年中,免疫学家在患有不同自身免疫疾病的患者血清中发现自身抗体能够以某种方式结合于其各自的细胞内抗原^{6,7,8}。虽然不能确定自身免疫患者体内的针对细胞内蛋白的抗体是否确实导致疾病,或甚至破坏细胞,但我们强调我们对这项工作的主要贡献是针对细胞内蛋白的抗体可发挥治疗作用。

[0456] PRL-1(肝再生磷酸酶-1),PRL-2,和PRL-3代表细胞内蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)家族的有趣亚组。与其正常对应物相比,单个PRL在多种癌细胞系和癌症组织中过表达⁹。最近的一篇重要综述很好地描述了在癌症进展中的这些PRL-PTP¹⁰。PRL是细胞内C端异戊烯化的磷酸酶。通过EM免疫金标记可显示PRL-1和PRL-3在质膜内叶和早期核内体中的定位^{11,12}。相反,缺乏异戊烯化信号的PRL的突变型通常位于细胞核中¹³。根据PRL-3为100%CRC的肝转移中过表达的唯一基因这一研究结果,首次发现PRL-3为与结肠直肠癌(CRC)转移相关的转移相关磷酸酶¹⁴。随后显示PRL的过表达在促进癌症转移中具有诱因作用,并且其成为不同癌症治疗的潜在的唯一靶点¹⁵。然而,由于磷酸酶位于细胞内,因此使用治疗抗体传统方法似乎为一项艰巨的任务。在我们的早期研究中,我们报导了意外的观察数据,其中抗PRL-1和PRL-3的小鼠单克隆抗体(mAb)能够阻止过表达细胞内EGFP标记的PRL-1和PRL-316的癌细胞的实验性转移¹⁶。

[0457] 在该研究中,我们使用新生成的嵌合PRL-3抗体进一步评价了该靶向策略的可靠性。这里,我们在五个重要方面将早期研究进行扩展以用于未来潜在的抗细胞内癌蛋白的临床治疗。首先,我们生成并利用临床相关的嵌合抗体代替小鼠抗体。其次,我们处理小鼠中的天然存在的表达内源性PRL-3的人类癌细胞而不是在中国仓鼠细胞(CHO)中的外源性PRL-3。第三,我们表明自然杀伤(NK)细胞的耗尽可提高肿瘤的植入。第四,我们通过使用配对裸鼠和scid小鼠模型发现B细胞在测定我们的抗体疗法的结果中具有关键作用。最后,通过IVIS实时成像系统使用荧光标记的抗体监测抗体-肿瘤结合活性;我们提出了在治疗和未治疗小鼠中抗体治疗的两种工作模型。目前针对可能的方法提出了基于证据的概念,使用抗体治疗靶向细胞内癌蛋白。结果表明需要对癌症治疗中作为可能靶点的一系列细胞内癌蛋白(如磷酸酶,激酶,转录因子)进行评价。

[0458] 实施例21.材料和方法(E2部分):特异性PRL-3人类/小鼠嵌合mAb(克隆#318)的生成

[0459] 为了生成PRL-3嵌合mAb,使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN,cat#74104)从 6×10^6 个杂交瘤细胞(克隆#318)¹⁹中提取总RNA。然后使用Superscript II RNase H(Invitrogen,Cat 18064-014)将RNA逆转录为cDNA。所产生的总cDNA用作模板以使用Ig-Prime试剂盒(Novagen,cat#69831-3)通过PCR(95°C-4°C-72°C,30次循环)生成“一般可变区”。使用TA克隆试剂盒(Invitrogen,part#45-0640)将PCR片段克隆为PCR II-TOP0-载体。使用Mfe I和Xho I切割PCR片段,然后插入到人类IgG 1恒定区表达载体-pCMV-人类IgG1¹⁷的各自位点中以将小鼠重链的可变区(克隆#318)¹⁸与人类IgG1恒定区结合。对末端含有Apa I和Pst I限制性酶切位点的小鼠轻链的可变区(克隆#318)进行相似的PCR步骤。使用Apa I和Pst I切割PCR片段,然后插入到含有克隆#318的重链可变区的人类IgG 1恒定区表达载体的各自位点中。将完整构建体短暂地转染至在超低IgG FBS培养的293T细胞(Gibco,16250-078)中。随后从培养物上清液中收获嵌合mAb,并使用离心过滤装置(Millipore,cat#UFC900596)浓

缩可达40倍。通过间接免疫荧光(IF)和蛋白质印迹分析测试嵌合mAb的特异性。

[0460] 实施例22.材料和方法(E2部分):细胞系和细胞培养

[0461] HCT116(CCL-247)人结肠直肠癌细胞系,H460(NCI-H460)人非小细胞肺癌细胞系,A431(CRL-1555)人鳞状细胞癌细胞系,B16F0(CRL-6322)和B16F10(CRL-6475)小鼠黑色素瘤细胞系购自美国典型培养物中心(American Type Culture Collection)(ATCC, Manassas,VA)。A2780(Cat#93112519)人卵巢癌细胞系购自ECACC,UK。在供应商推荐的合适培养基中培养细胞。

[0462] 实施例23.材料和方法(E2部分):蛋白质印迹分析

[0463] 小鼠PRL-3单克隆抗体的生成和蛋白质印迹程序如前所述¹⁸。GAPDH抗体来自Cell Signaling Technology(Beverly,MA)。

[0464] 实施例24.材料和方法(E2部分):小鼠中的实验性转移分析²⁰

[0465] 在第1天通过尾静脉向8周龄裸鼠(Jackson Labs,美国)的血液循环中注射 1×10^6 个癌细胞。使用嵌合PRL-3 mAb或小鼠PRL-3或PRL-1mAb治疗小鼠;癌细胞注入后第3天进行第一次抗体治疗,接着每周给予两次。对于未治疗对照组,通过尾静脉给予PBS。所有动物研究均由IMCB的伦理委员会批准,并严格遵守新加坡科技研究局(A*STAR)的动物设施中心的规则和政策。

[0466] 实施例25.材料和方法(E2部分):NK细胞的耗尽

[0467] 抗去唾液酸GM 1抗血清(兔)购自Wako Pure Chemical Industries,Ltd(Osaka 540-8605,日本)。在实验性转移分析24h前通过尾静脉将GM1抗血清(50 μ l)注入到八周龄裸鼠(Jackson Labs,USA)的血液循环中。

[0468] 实施例26.材料和方法(E2部分):统计分析

[0469] 使用Kaplan-Meier法估算累积生存率和生存率差异,并且认为p值小于0.01具有统计学意义。

[0470] 实施例27.材料和方法(E2部分):抗体标记和IVIS实时成像

[0471] 使用CF TM 750染料抗体标记试剂盒标记纯化的PRL-3抗体(http://www.biotium.com/product/product_info/Newproduct/Mix-n-Stain_Kits.asp)。在实时成像前1小时通过尾静脉注入标记的抗体。Bioware Ultra细胞系HCT 116-luc2(www.caliperLS.com)为表达荧光素酶的细胞系,其在人类泛素C启动子作用下稳定转染了萤火虫荧光素酶基因(luc2)。通过使用HCT116人腺癌(ATCC,CCL-247TM)并在人类泛素C启动子控制下转导含有荧光素2基因的慢病毒(pGL4 luc2)来建立HCT116-Luc2细胞系。将 1×10^6 个HCT 116-luc2癌细胞通过尾静脉注入8周龄裸鼠体内(Jackson Labs,美国)。在第3天将抗体通过尾静脉注入治疗小鼠中,之后每周注射抗体两次。治疗7周后,使用荧光素溶液(15mg/ml或30mg/kg,在PBS中,剂量为150mg/kg)通过腹腔途径注入小鼠体内,允许其在唤醒的动物中分布约5-15分钟。将小鼠置于透明的树脂玻璃麻醉箱(2.5-3.5%异氟醚)中,使用IVIS®Spectrum成像系统3D系列进行无障碍的可视化监测,以体内跟踪并监测肿瘤发展。测定了治疗与未治疗小鼠之间的结果。

[0472] 实施例28.材料和方法(E2部分):FACS分析

[0473] 在含有高葡萄糖(4.5g/L),并补充了10%FBS和5%抗生素的DMEM中培养人类鳞状细胞癌细胞系A431。在补充了10%FBS和5%抗生素的RPMI中培养B16F0和B16F10细胞。使用预热

的非酶细胞裂解液(Sigma, Cat# c-5914)使细胞(5×10^6)从培养皿上脱落,转移至5ml聚苯乙烯管中,并使用完全培养基洗涤一次。然后使用在100 μ l完全培养基中的1 μ l EGFR (Genetech, 美国)或5 μ l PRL-3一级小鼠抗体¹⁸在室温下(RT)孵化细胞1小时。每15min摇动细胞以防止结块。然后使用完全培养基洗涤细胞2x,并使用羊抗鼠AlexaFluor 546抗体 (Invitrogen, 美国)在RT下孵化1小时,洗涤并重悬在1ml完全培养基中,之后使用BD FACS Caliber进行分析。使用WinMDI ver2.8软件处理原始数据。

[0474] 实施例29. 材料和方法(E2部分): 使用免疫组织化学(IHC)进行组织病理分析

[0475] 人类肺组织阵列009-01-004; 和CC00-01-006; CC04-01-CC04购自Cybrdi, Inc. (Rockville, Maryland 20850美国USA: <http://cybrdi.com/index.php>)。人类AML骨髓样本获自国立大学医院-新加坡国立大学(NUH-NUS)组织保藏库, 由NUH-NUS的伦理委员会(IRB)批准研究使用。所有人类组织样本包括商业样本的使用均由分子与细胞生物学院的伦理委员会(IRB)批准。我们使用Dako En Vision™系统K 1395(Dako, Carpinteria, CA)进行IHC分析^{18, 19}。

[0476] 实施例30. 结果(E2部分): PRL-3小鼠/人类嵌合抗体(克隆#318)的生成

[0477] 我们之前曾报导PRL-3或PRL-1小鼠mAb能够特异性靶向其各自的细胞内PRL-3或PRL-1磷酸酶以抑制裸鼠中癌症转移¹⁶。为了尝试将我们的实验室研究结果转化为临床应用, 我们设计了抗PRL-3的小鼠/人嵌合mAb以使小鼠mAb在人类中的潜在抗原性最小化。我们使用重组DNA技术, 通过免疫球蛋白基因的转基因融合分别将人类IgG1分子的重链或轻链的恒定域¹⁷与小鼠PRL-1 mAb是可变区(克隆#318)¹⁸融合(图7A)。将表达构建体转染至人胚肾细胞293T中以产生重组PRL-3嵌合mAb, 随后从培养基中收获并进一步浓缩。通过在过表达外源性EGFP-PRL-3的DLD-1细胞中进行间接免疫荧光(图7B)和蛋白质印迹分析(图7C), 证实了较好地保存了抗原结合特异性。PRL-3嵌合mAb特异性识别EGFP-PRL-3(~48kDa)和myc-PRL-3(~21kDa)(图7C, 第1-2道)但不与myc-PRL-1和myc-PRL-2蛋白反应(图7C, 第3-4道)。在小鼠黑色素瘤B16F0细胞中针对嵌合抗体进行50%细胞抑制细胞毒性浓度实验(IC50), 当在正常培养条件下在10%FBS培养基中培养细胞时, 即使在高浓度(40g/ml)下我们也未观察到对生存力的细胞毒性(数据未示出)。由于PRL-1, -2和-3在多种人类癌症中过表达¹⁹, 我们预期PRL抗体可能在阻止不同类型的PRL阳性癌症扩散中具有广泛应用, 尤其是短时间内经常复发的一些致命恶性肿瘤如肺癌和急性髓细胞样白血病(AML)。在肺癌中, 我们发现PRL-3在31%的鳞状细胞癌和26%的腺癌中过表达(图1A-C), 其为高复发性非小细胞肺癌的两种主要亚型包括80%的人类肺癌(http://en.wikipedia.org/wiki/Lung_cancer#Non-small_cell_lung_carcinoma_.28NSCLC.29)。我们也发现PRL-3在35%(69例中的24例)的AML中过表达(图12D)。在PRL-3阳性癌症术后注射数次PRL-3嵌合抗体治疗将清除微转移残余物和循环的癌细胞以防止复发。

[0478] 实施例31. 结果(E2部分): PRL-3嵌合抗体有效抑制由表达内源性PRL-3的B16F0癌细胞形成的转移性肿瘤, 但不抑制由不表达内源性PRL-3的B16F10癌细胞形成的转移性肿瘤

[0479] 为了寻找PRL-3相关癌症的临床相关动物模型, 我们通过蛋白质印迹分析针对内源性PRL-3蛋白的表达水平筛选了数个癌细胞系。适合我们的动物模型的理想细胞系应具有对比鲜明的内源性PRL-3水平, 并应具有短期内在小鼠中诱导转移性肿瘤的能力。我们发

现两种小鼠黑色素瘤细胞系B16F0和B16F10(F0和F10)可满足所需试验的标准。虽然F10细胞天然地比F0细胞转移性更强,但我们发现亲代F0细胞表达内源性PRL-3蛋白的水平比F10细胞更高(图8A),表明F10细胞的转移活性不再具有PRL-3依赖性。当我们采用实验性转移分析²⁰时,其中通过外侧尾静脉注射将所培养的癌细胞引入裸鼠的血液循环中,F0和F10细胞系均能够在17天内在小鼠中迅速形成多个转移性肿瘤。抗体治疗后不久,我们可观察这些侵袭性的体内转移模型的治疗和未治疗组之间的疗效差异。在癌细胞注射后第3天(我们在治疗中可延迟的最长时间),同样通过尾静脉将嵌合PRL-3抗体给予“治疗”小鼠,之后每周给予抗体两次(图8B)。在实验末期,我们发现PRL-3嵌合抗体可消除表达PRL-3的F0癌细胞形成的肿瘤;并且在实验末期,“治疗小鼠”的多个组织中的转移性肿瘤急剧下降(图8C)。F0受体的Kaplan-Meier生存分析将随后进行讨论(图10A,c)。在平行实验中,PRL-3抗体对阻止由不表达PRL-3蛋白的F10癌细胞形成的转移性肿瘤无作用。在治疗和未治疗的F10细胞受体的肺中均发现数百个转移性肿瘤,并且在“未治疗小鼠”(图8D,顶部画面)和“治疗小鼠”(图8D,底部画面)之间无明显差异。此外,Kaplan-Meier生存分析表明PRL-3抗体不能延长“治疗”F10受体的存活时间(图8E)。

[0480] 实施例32. 结果(E2部分):PRL-3嵌合抗体有效抑制由表达内源性PRL-3的人类癌细胞形成的转移性肿瘤的形成,但不抑制由不表达内源性PRL-3的癌细胞形成的转移性肿瘤的形成

[0481] 除了小鼠F0黑色素瘤细胞,我们还发现HCT116-luc2,HCT-116人结肠直肠癌细胞系,和A2780人卵巢癌细胞系表达内源性PRL-3蛋白(图9A,第1-3道)。之前也报导A2780为PRL-3阳性细胞系²¹。作为对照,我们发现了一种不表达内源性PRL-3的人类非小细胞肺癌细胞系(NCI-H460)(图9A,第4道)。不论为PRL-3阳性或阴性,这四种人类癌细胞系均可在1-2个月内分别在裸鼠体内快速形成转移性肿瘤。HCT-116-luc2为表达荧光素酶的细胞系,其中在HCT-116细胞中稳定转染了萤火虫荧光素酶基因(luc2)。通过在人类泛素C启动子控制下转导含有荧光素2基因的慢病毒来建立该细胞系。该细胞系可用于体内,通过Xenogen's IVIS®Spectrum Series成像来监测肿瘤形成。使用该系统,由于在抗体治疗7周时的实时成像中观察到转移性肺肿瘤明显降低,因此我们证明PRL-3抗体能够抑制HCT116-luc2癌细胞的转移(图9B)。此外,发现在使用HCT-116细胞孵化后2个月(图9C,a)和使用A2780孵化后1个月(图9C,b)的PRL-3抗体治疗和未治疗小鼠中具有显著差异。PRL-3mAb治疗的动物看起来活跃且健康(可达4个月),而未治疗小鼠均体重减轻并濒死。同样地,NCI-H460(PRL-3阴性细胞)受体未响应PRL-3抗体治疗(图9C,c)。总之,这些结果进一步支持PRL-3抗体治疗的疗效与癌细胞的PRL-3表达状态密切相关这一结论。我们显示小鼠和嵌合PRL-3抗体治疗的疗效相当(图9D)。

[0482] 实施例33. 结果(E2部分):NK细胞在抗癌治疗中的重要性

[0483] 由于NK细胞是一类细胞毒性淋巴细胞,其构成固有免疫系统的主要成分,因此我们随后研究了自然杀伤(NK)细胞是否在PRL-3抗体治疗中起作用。为了消耗裸鼠中的NK细胞,我们使用抗去唾液酸GM-1对裸鼠进行预注射²²。在这些注射GM-1的裸鼠中进行我们上述的抗体治疗程序。我们发现在注射GM-1的小鼠中基本失去疗效(图13)。更糟的是,该注射GM-1的裸鼠显示在肺脏,肝脏,肾上腺,睾丸和骨中具有更严重的携带肿瘤的(黑色)负荷,表明固有免疫系统在我们的抗体治疗中很重要。已证明NK细胞在人类造血干细胞抑制排斥中的

作用²²,除去NK细胞可使NK细胞活性的移植排斥消除,使肿瘤植入更成功,因此,注射GM 1的“PRL-3治疗”小鼠在肿瘤生长方面不如未注射GM 1的“PRL-3未治疗”小鼠。

[0484] 实施例34.结果(E2部分):B细胞在介导PRL-3抗体的治疗效应中可能起重要作用

[0485] 目前为止,我们在T细胞缺陷的裸鼠中进行了PRL-3抗体治疗。为了确定B淋巴细胞在我们的抗体治疗模型中是否起关键作用,我们接下来在缺乏功能性淋巴细胞的重症联合免疫缺陷(scid)小鼠中进行抗体治疗,由于其携带损伤免疫球蛋白的离散基因元件重排和T细胞抗原受体基因的缺陷,从而干扰B和T淋巴细胞祖细胞的成熟和分化。因此其虽然具有正常NK细胞,巨噬细胞和粒细胞,但仍显示影响B和T淋巴细胞的重症联合免疫缺陷。对于HCT-116诱导的转移性肿瘤,Kaplan-Meier生存曲线分析显示与未治疗小鼠相比,PRL-3抗体治疗使裸鼠寿命统计学显著增加($P < 0.001$)但scid小鼠未增加(图10A,a-b)。有趣的是,我们发现与未治疗小鼠(11周)相比,治疗的注射了HCT-116的裸鼠(16周)的中位生存时间提高45%。相反,在注射了HCT-116的scid小鼠的未治疗和治疗组中,我们观察到PRL-3抗体治疗的效果无差异,显示相似的中位生存时间(11周)。此外,我们采用F0 PRL-3阳性癌细胞系以利用相似策略证实该研究结果。在注射了F0的裸鼠中(图10A,c-d),PRL-3抗体治疗使中位生存时间提高47%(治疗的为24天,未治疗的为17天)。与之前一致,抗体对未治疗或治疗的注射F0的scid小鼠无作用,两组均显示相似的中位寿命(~17天)。由于使用小鼠或嵌合PRL-3抗体可获得相似结果,因此机理不依赖于抗体种类(图10B,a-d)。总之,来自这些基因小鼠模型的结果表明抗转移性肿瘤形成的PRL-3抗体疗效取决于B细胞而不是T细胞。我们认为除了产生抗体,B细胞可具有分泌能够促进抗体作用的未知因子的其它功能。事实上,我们的初步数据表明B细胞可分泌因子以促进癌细胞摄取抗体。我们观察到当在人类B细胞的培养物上清液存在下进行试验时,抗体在PRL-3阳性F0细胞中的内化大幅增加。类似地,无PRL-3的F10细胞在B细胞条件培养基存在下或存活的B细胞存在下均不能储存任何抗体(数据未示出)。

[0486] 实施例35.结果(E2部分):PRL-3抗原在细胞表面是不显著的

[0487] PRL-3抗体作用的可能机理是与细胞表面抗原结合,从而引发表达PRL-3的细胞的B细胞依赖性消除。然而,到目前为止没有报导描述PRL-3的细胞表面定位。为了确定PRL-3抗体与其细胞表面抗原结合的可能性,我们使用通常用于细胞表面标记的FACS分析。作为阳性对照,该试验使用过表达EGFR的人类鳞状细胞癌A431细胞系与抗EGFR抗体结合。我们发现使用抗EGFR抗体孵化A431细胞在FACS分析中引起不同的峰移位(图11A,a)。然而,使用或未使用抗PRL-3抗体孵化的F0(PRL-3阳性)或F10(PRL-3阴性)细胞中均未观察到峰移位(图11A,b-c)。这些结果表明细胞表面PRL-3抗原,如果有的话,不太可能为抗体结合和摄取的主要原因。然而,由于在体内免疫系统持续抵御侵入物,如细菌和病毒和癌细胞,因此癌细胞可被破坏并以某种方式将其细胞内蛋白暴露于免疫系统。如果是这样,相同的可能性也适用于其它细胞内癌蛋白。

[0488] 实施例36.结果(E2部分):基于IVIS实时成像的工作模型

[0489] 在我们的动物模型系统中,我们发现抗体治疗在癌细胞注射3天后无效,表明前3天足以使癌细胞植入新组织中。使用IVIS系统通过标记的抗体-抗原结合来跟踪转移性肿瘤的位点,我们在本文中提出两种工作模型(图11B),a治疗小鼠。1.在早期癌细胞成簇,及时引入抗体可在血液循环中捕获抗原特异性癌细胞,或在淋巴系统中,在淋巴细胞(如B,和

NK细胞)的帮助下通过固有免疫系统破坏并除去这些癌细胞。2. 逃逸的癌细胞能够到达新的器官以植入;因此,重要的是持续向血液循环给予抗体以除去这些早期肿瘤并防止其进一步发展,破坏并将其从宿主免疫系统中清除。3. “治疗小鼠”中的早期肿瘤完全没有机会形成肿瘤,因此处于暴露于免疫系统的开放阶段。此外,我们发现小肿瘤(H&E肺切片)中的血管密度高于大肿瘤。因此,荧光标记的抗体可通过血液循环容易地进入“治疗小鼠”的转移性肺肿瘤中。因此我们观察到“治疗的”转移性肺具有较强的荧光标记。b. 未治疗的小鼠。不进行上述早期步骤;未受抑制的癌细胞迅速在宿主中繁殖。大量的癌细胞不受控制地植入并具有足够时间形成微转移至宏观转移,建立起以肿瘤边界“围墙(fences)”作为防御系统的领域,进入远离免疫系统的封闭期,此外,我们发现较大区域的肿瘤具有较低的血管密度,血液供应不足导致坏死(未示出)。因此,荧光标记的抗体不易通过血液供应到达“未治疗小鼠”的转移性肺肿瘤中。因此我们发现“未治疗的”转移性肺具有较弱的荧光标记。

[0490] 实施例30. 讨论(E2部分)

[0491] PRL-3在多种类型的人类癌症中上调。可预见的PRL-3嵌合抗体将会是能够阻止不同的PRL-3相关的癌症转移的有前景的治疗药物。我们希望以通常在短时间内复发的致命的恶性肿瘤(如肺癌和AML)作为努力的开始。由于这些癌症具有侵袭性,容易观察治疗效果并且可明确定义治疗和未治疗患者的结果。尤其是,白血病细胞容易接近并直接与循环系统中的抗体接触。临床试验更可能招募患有这些侵略性癌症的晚期患者。有希望地,这些实例的成功将影响使用抗体治疗靶向其它细胞内蛋白,其为转化研究的重要领域并可提供癌症患者可行的替代治疗。

[0492] 本文所述的这些非传统研究的分子机理仍然难以描述并正在积极研究中。目前,了解抗体如何在体内破坏肿瘤对于我们仍然是“黑盒子”。同样,虽然抗HER2/neu抗体治疗已多年在临床上用于治疗乳腺癌,但已耗费多于二十年的时间来了解熟知的抗HER2/neu抗体治疗的机理²³。期待使用体外系统解开“黑盒子”是不切实际的,由于主要考虑到由于孵化器中培养的单一细胞类型的限制而使传统体外细胞培养系统过于简化,通常使用辅以10%胎牛血清的培养基,缺少免疫系统参与,因此不可能在100%天然血液循环和淋巴系统中实际模拟体内多种类型的细胞和器官的复杂性。无论机制如何,该研究的核心部分为抗细胞内蛋白的抗体可发挥疗效,并且更重要的是效果具有重现性。如果我们在人体内可看到相同的疗效,则在癌症治疗中具有巨大价值,可支持抗体治疗可用于靶向细胞内抗原这一未公认的观念。

[0493] 然而,我们为了解“黑盒子”中可能事件的努力尝试使我们从该研究中获得几种结论:1. PRL-3抗体治疗与癌细胞的PRL-3表达状态密切相关。我们表明嵌合抗体确实可成功阻止来自表达内源性细胞内PRL-3磷酸酶的几种癌细胞系(B16F0, HCT-116, 和A2780)的转移性肿瘤的形成。由于抗体不能有效阻止来自不表达PRL-3的其它癌细胞系(B16F10, H460)的转移性肿瘤的形成,因此具有特异性。此前我们已证明小鼠PRL-3抗体不能有效抑制由另一种PRL-3阴性癌细胞系—CT26小鼠结肠癌细胞形成的转移性肺肿瘤¹⁶。总之,数据可支持小鼠或嵌合PRL-3抗体的治疗效果与癌细胞的PRL-3表达状态密切相关这一观点。如果癌细胞的转移特性不是由于PRL-3过表达(如B16F10, H460, CT26细胞),则给予PRL-3mAb不能有效阻止由这些PRL-3阴性细胞形成的肿瘤。此外,我们之前¹⁶显示虽然PRL-1和PRL-3的蛋白序列具有很高的同源性,但PRL-1mAb特异性阻止PRL-1(而不是PRL-3)转移性肿瘤;而PRL-

3mAb特异性阻止PRL-3(而不是PRL-1)转移性肿瘤。这些结果表明PRL抗体治疗对其抗原具有高度特异性,并不涉及与其它非特异性细胞表面蛋白的交叉反应。2.“固有免疫系统”中的NK细胞参与该治疗。为了解固有免疫系统是否参与抗体治疗,我们通过尾静脉向裸鼠静脉注射GM1抗体以消耗NK细胞,所述NK细胞为构成固有免疫系统主要成分的一类细胞毒性淋巴细胞。在缺乏NK细胞时,我们发现抗PRL-3抗体未显示治疗效果。此外,肿瘤植入大大提高(图13),表明NK细胞通常在植入外来细胞的移植排斥中起关键作用。之前,越来越多的证据表明NK细胞在破坏早期肿瘤中发挥重要作用²⁴。3.ADCC也可参与治疗。所描述的抗体治疗的最佳机理为抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在ADCC中,抗体结合于特定细胞表面抗原并引发Fc介导的免疫应答,其涉及细胞毒性CD8T细胞,补体激活,和/或NK细胞活化。虽然我们在PRL-3阳性F0细胞和PRL-3阴性F10细胞的PRL-3细胞表面抗原的FACS分析中未观察到任何峰移位,但我们不能排除这些癌细胞在异常炎症压力下的可能性,其可导致癌细胞破坏并释放和暴露其细胞内蛋白以被抗体攻击并以某种方式引发特异性免疫应答,导致淋巴细胞清除这些癌细胞。可替换地,癌细胞在体内处于缺氧应激和血清剥夺下,其为将细胞抑制在G₁和G₀期的条件²⁵。这些条件可能导致细胞内抗原释放以供抗体识别。如果这样,其它细胞内癌蛋白也可遇到类似情况,因此可类似地使用抗体治疗对它们进行靶向。4.“适应性免疫系统”(IgM和/或B细胞)在mAb疗效中具有重要性。我们采用无胸腺裸鼠和免疫缺陷scid小鼠进行肿瘤降低试验,并仅在裸鼠而未在scid小鼠中达到疗效。裸鼠和scid小鼠之间的主要差异为裸鼠为T细胞缺陷,但具有功能性IgM抗体和B细胞,而scid小鼠不具有包括B,T细胞和IgM和其它抗体的功能性适应性免疫系统。裸鼠和scid小鼠均具有包括NK细胞和补体激活的完整的固有免疫系统,但仅在裸鼠(非scid小鼠)中发现阳性应答,表明成熟B细胞(而非T细胞)和IgM/血清抗体可能很重要。由于将抗体外源性引入小鼠中需要B细胞以发挥抗转移性PRL-3抗体活性,因此推测B细胞在抗体应答中具有另一个作用,可能是通过分泌能够调节宿主应答的任意给定抗体的不明因子。总之,我们强调固有和获得免疫系统的复杂相互作用对靶向细胞内PRL-3癌蛋白的嵌合抗体的抗癌疗效至关重要。5.抗体治疗不能靶向所有细胞内癌蛋白。理想的抗癌治疗药物应特异性靶向癌细胞,同时不伤害正常组织。应强调由于PRL-3在正常组织中的表达不是普遍存在的,因此PRL-3嵌合抗体治疗在裸鼠中具有极小的可检测副作用。我们表明仅在一些器官如脾脏,脑和胰腺中检测到PRL-3蛋白(图14A)。相反,PRL-2在大多数小鼠组织中广泛表达(图14B)。正如我们预料,对表达PRL-2的癌症的PRL-2抗体治疗是不成功的(图14C)。PRL-2抗体治疗的小鼠比未治疗小鼠死亡早1周或显示更糟的结果,可能由于PRL-2在大多数小鼠组织中广泛表达,表明PRL-2抗体可能会攻击正常组织并导致该不良副作用。结果表明良好的治疗靶点应对肿瘤抗原具有更高的特异性而不损害正常组织。6.针对细胞内癌蛋白的抗体治疗具有临床相关性。为了产生侵袭性很强的癌症模型以进行治疗,我们直接将一百万个癌细胞注入裸鼠的血液循环中;裸鼠中的血液总量为其体重的8%(~19g的8%=1.5ml)。人体(50kg)内的血液总量为约4.7升。如果将一百万个癌细胞注入裸鼠中的~1.5ml血液循环;相当于在人体的~4.7升血液中具有3133百万个(4.7升/1.5ml)癌细胞。癌细胞注射后3天开始抗体治疗(静脉注射至尾静脉)的显著治疗效果表明治疗非常有效。如果我们能够使治疗的患者达到与小鼠系统相似的寿命延长,对于总寿命和延长的预期寿命来说相当于人类的数年。手术切除可见的PRL-3相关实体肿瘤后,由于PRL-3抗体会清除循环的癌细胞²⁶或除去不可见的早期肿瘤,因此我们根据

这些临床前研究和现实情况预期数次注射嵌合抗体对降低复发率至关重要。

[0494] 因此,在PRL-3抗体治疗的裸鼠中缺乏任何可观察的副作用进一步表明其潜在的临床功效。我们的数据促进了对作为抗癌mAb治疗的可能靶点的一系列肿瘤特异性细胞内癌蛋白的再评价,从而实现这些“魔法子弹”的全部潜力。

[0495] 实施例38.参考文献(E2部分)

[0496] 1.D.Hanahan and R.A.Weinberg,The Hallmarks of Cancer.Cell.100(1),57-70(2000).

[0497] 2.J.M.Reichert,C.J.Rosensweig,L.B.Faden and M.C.Dewitz,Monoclonal Antibody Successes in the Clinic.Nat Biotechnol.23(9),1073-1078(2005).

[0498] 3.K.Imai and A.Takaoka,Comparing Antibody and Small-Molecule Therapies for Cancer.Nat Rev Cancer.6(9),714-727(2006).

[0499] 4.M.Baker,Upping the Ante on Antibodies.Nat Biotechnol.23(9),1065-1072(2005).

[0500] 5.Ruiz-Arguelles and D.Alarcon-Segovia,Penetration of Autoantibodies into Living Cells.Isr Med Assoc J.3(2),121-126(2001).

[0501] 6.D.Alarcon-Segovia,L.Llorente,A.Ruiz-Arguelles,Y.Richaud-Patinand B.Perez-Romano,Penetration of Anti-DNA Antibodies into Mononuclear Cells Causes Apoptosis.Arthritis Rheum.38,S179-182(1995).

[0502] 7.D.Portales-Pérez,D.Alarcon-Segovia,L.Llorente,R.-A.e.A,C.Abud-Mendoza,L.Baranda,H.De-la-Fuente,T.Ternyck,R.Gonzalez-Amaro and J., Penetrating Anti-DNA Monoclonal Antibodies Induce Activation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.J Autoimmun.11(5),563-571(1998).

[0503] 8.T.D.Golan,A.E.Gharavi and K.B.Elkon,Penetration of Autoantibodies into Living Epithelial Cells.J Invest Dermatol.100(3),316-322(1993).

[0504] 9.B.J.Stephens,H.Han,V.Gokhale and D.D.Von Hoff,Prl Phosphatases as Potential Molecular Targets in Cancer.Mol Cancer Ther.4(11),1653-1661(2005).

[0505] 10.D.C.Bessette,D.Qiu and C.J.Pallen,Prl Ptps:Mediators and Markers of Cancer Progression.Cancer Metastasis Rev.27(2),231-252(2008).

[0506] 11.J.Wang,C.E.Kirby and R.Herbst,The Tyrosine Phosphatase Prl-1 Localizes to the Endoplasmic Reticulum and the Mitotic Spindle and Is Required for Normal Mitosis J Biol Chem.277(48),46659-46668(2002).

[0507] 12.Q.Zeng,X.Si,H.Horstmann,Y.Xu,W.Hong and C.J.Pallen,Prenylation-Dependent Association of Protein-Tyrosine Phosphatases Prl-1,-2,and -3 with the Plasma Membrane and the Early Endosome.J Biol Chem.275(28),21444-21452 (2000).

[0508] 13.X.Si,Q.Zeng,C.H.Ng,W.Hong and C.J.Pallen,Interaction of Farnesylated Prl-2,a Protein-Tyrosine Phosphatase,with the Beta-Subunit of Geranylgeranyltransferase Ii.J Biol Chem.276(35),32875-32882(2001).

[0509] 14.S.Saha,A.Bardelli,P.Buckhaults,V.E.Velculescu,C.Rago,B.St Croix,

- K.E.Romans,M.A.Choti,C.Lengauer,K.W.Kinzler and B.Vogelstein,A Phosphatase Associated with Metastasis of Colorectal Cancer.Science.294,1343-1346(2001).
- [0510] 15.Q.Zeng,J.-M.Dong,K.Guo,J.Li,H.-X.Tan,V.Koh,C.J.Pallen,E.Manser and W.Hong,Prl-3 and Prl-1 Promote Cell Migration,Invasion,and Metastasis.Cancer Res.63(11),2716-2722(2003).
- [0511] 16.K.Guo,J.P.Tang,C.P.B.Tan,H.Wang and Q.Zeng,Monoclonal Antibodies Target Intracellular Prl Phosphatases to Inhibit Cancer Metastases in Mice.Cancer Biol Ther.7(5),750-757(2008).
- [0512] 17.J.H.Brendon,C.M.Adrianus and P.C.Angeline,Passive Immunoprophylaxis and Therapy with Humanized Monoclonal Antibody Specific for Influenza a H5 Hemagglutinin in Mice.Respir Res.7,126-136(2006).
- [0513] 18.J.Li,K.Guo,V.W.Koh,J.P.Tang,B.Q.Gan,H.Shi,H.X.Li and Q.Zeng, Generation of Prl-3-and Prl-1-Specific Monoclonal Antibodies as Potential Diagnostic Markers for Cancer Metastases.Clin Cancer Res 11(6),2195-2204 (2005).
- [0514] 19.H.Wang,L.A.Vardy,C.P.Tan,J.M.Loo,K.Guo,J.Li,S.G.Lim,J.Zhou, W.J.Chng,S.B.Ng,H.X.Li and Q.Zeng,Pcbpl Suppresses the Translation of Metastasis-Associated Prl-3 Phosphatase.Cancer cell.18(1),52-62(2010).
- [0515] 20.B.Weigelt,L.P.Johannes and L.J.v.t.Veer,Breast Cancer Metastasis Markers and Models.Nat Rev Cancer.5(8),591-602(2005).
- [0516] 21.F.Polato,A.Codegoni,R.Fruscio,P.Perego,C.Mangioni,S.Saha, A.Bardelli and M.Broggini,Prl-3 Phosphatase Is Implicated in Ovarian Cancer Growth.Clin Cancer Res.11(19 Pt 1),6835-6839(2005).
- [0517] 22.H.Yoshino,T.Ueda,M.Kawahata,K.Kobayashi,Y.Ebihara,A.Manabe, R.Tanaka,M.Ito,S.Asano,T.Nakahata and K.Tsuji,Natural Killer Cell Depletion by Anti-Asialo Gml Antiserum Treatment Enhances Human Hematopoietic Stem Cell Engraftment in Nod/Shi-Scid Mice.Bone Marrow Transplant.26(11),1211-1216 (2000).
- [0518] 23.M.Kasai,T.Yoneda,S.Habu,Y.Maruyama,K.Okumura and T.Tokunaga,In Vivo Effect of Anti-Asialo Gml Antibody on Natural Killer Activity.Nature.291 (5813),334-335(1981).
- [0519] 24.S.Park,Z.Jiang,E.D.Mortenson,L.Deng,O.Radkevich-Brown,X.Yang, H.Sattar,Y.Wang,N.K.Brown,M.Greene,Y.Liu,J.Tang,S.Wang and Y.X.Fu,The Therapeutic Effect of Anti-Her2/Neu Antibody Depends on Both Innate and Adaptive Immunity.Cancer Cell.18(2),160-170(2010).
- [0520] 25.S.Cooper,Reappraisal of Serum Starvation,the Restriction Point,G0 and G1Phase Arrest Points.FASEB J.17(3),333-340(2003).
- [0521] 26.Y.Hüsemann,J.B.Geigl,F.Schubert,P.Musiani,M.Meyer,E.Burghart, G.Forni,R.Eils,T.Fehm,G.Riethmüller and C.A.Klein,Systemic Spread Is an Early

Step in Breast Cancer.Cancer cell.13(1),58-68(2008).

[0522] 实施例E3部分(实施例39).使用VHZ免疫C57BL6小鼠及监测肿瘤发展

[0523] E3部分包括实施例39。

[0524] 实施例39:E3部分:使用VHZ免疫C57BL6小鼠及监测肿瘤发展

[0525] 通过腹腔注射总体积为200ml的弗氏佐剂来免疫8周龄C57BL6小鼠:将100ml盐水中20mg的VHZ抗原与100ml完全佐剂(Cat#77140,Pierce)混合。

[0526] 注射总体积为200ml的佐剂进行之后的两次免疫:将100ml盐水中20mg的VHZ抗原与100ml不完全佐剂(Cat#77145,Pierce)混合。

[0527] 每2周给予第二次和第三次注射,将100-200ml的尾血收集在肝素涂覆的毛细管中。

[0528] 使用血液样本制备血浆并通过ELISA测量抗体效价。

[0529] ELISA的详细步骤如先前所描述。

[0530] 选择血清中具有高效价VHZ抗体的小鼠并通过外侧尾静脉注射 1×10^6 个表达VHZ的癌细胞。

[0531] 结果如图15所示。图15显示接种VHZ抗原的小鼠可预防表达VHZ的肿瘤。在该研究中将未接种的小鼠用作阴性对照。

[0532] 本文所述的每个申请和专利,和以上每个申请和专利中所引用或参考的文件,包括每个申请和专利(“申请引用文件”)的实施过程和制造商针对每个申请和专利和任何申请引用文件中引用或提及的任何产品的任何说明书或目录,均以引用方式并入本文。此外,所有本文中引用的文件,和所有本文引用的文件所引用或提及的文件,和制造商针对本文引用或提及的任何产品的任何说明书或目录均以引用方式并入本文。

[0533] 在不偏离本发明范围和精神的前提下,本发明所述方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员是显而易见的。虽然结合特定优选实施方式对本发明进行描述,但应理解所要求的发明不应过度限于该具体实施方式。实际上,对于分子生物学或相关领域的技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改将落入权利要求的范围内。

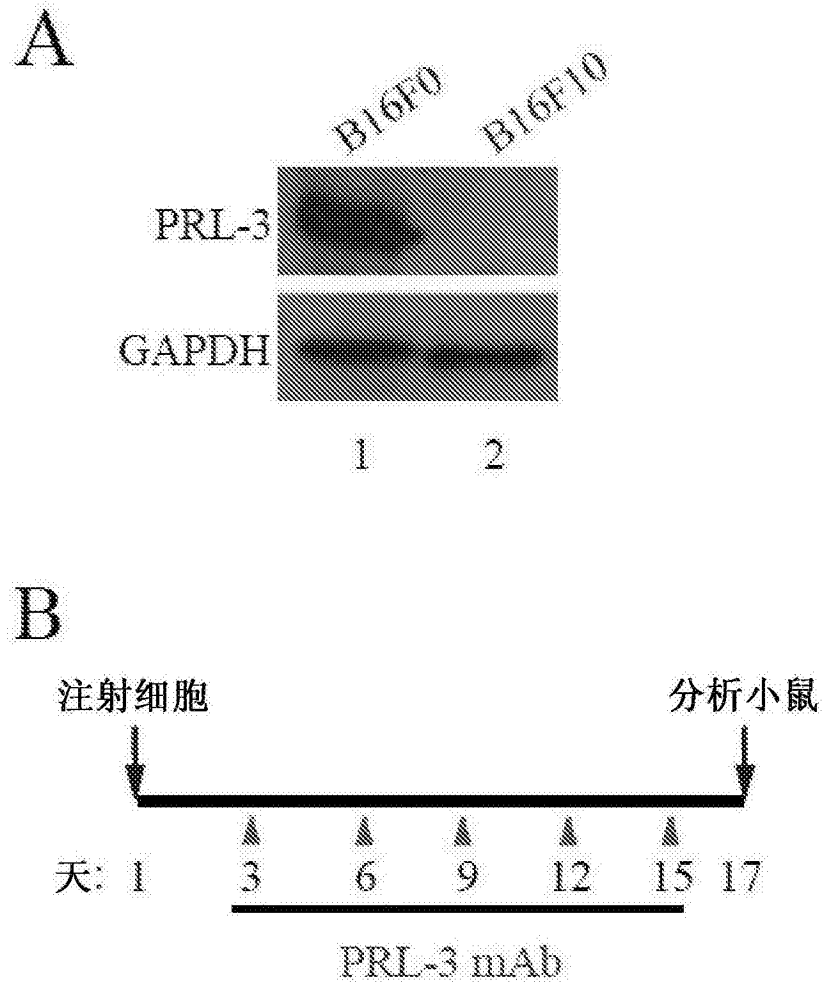


图1

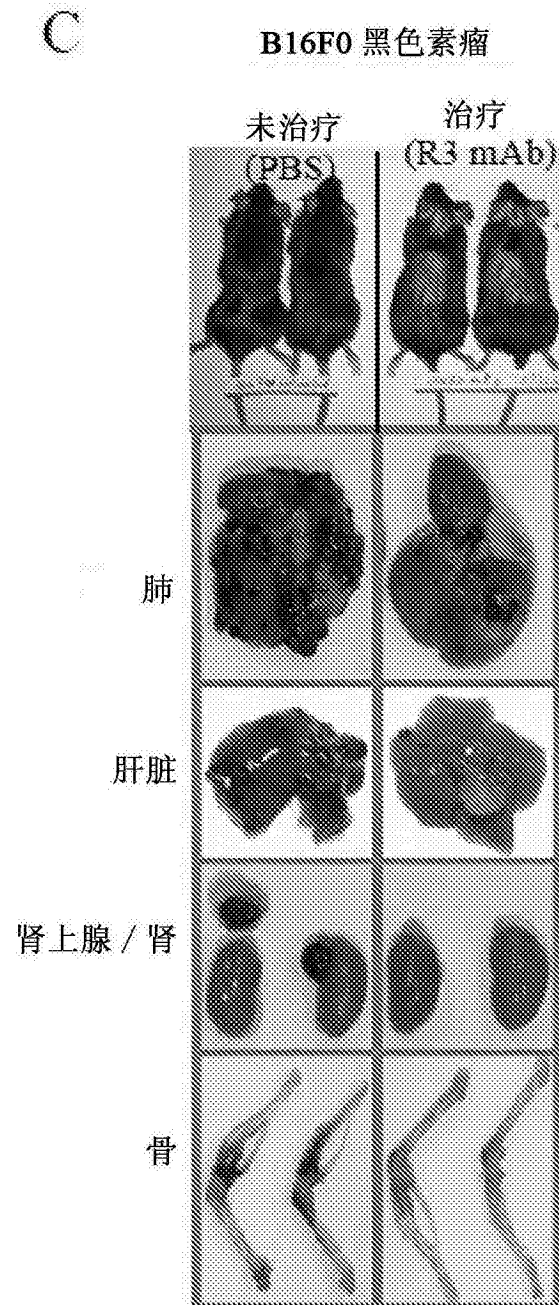


图1(续)

D

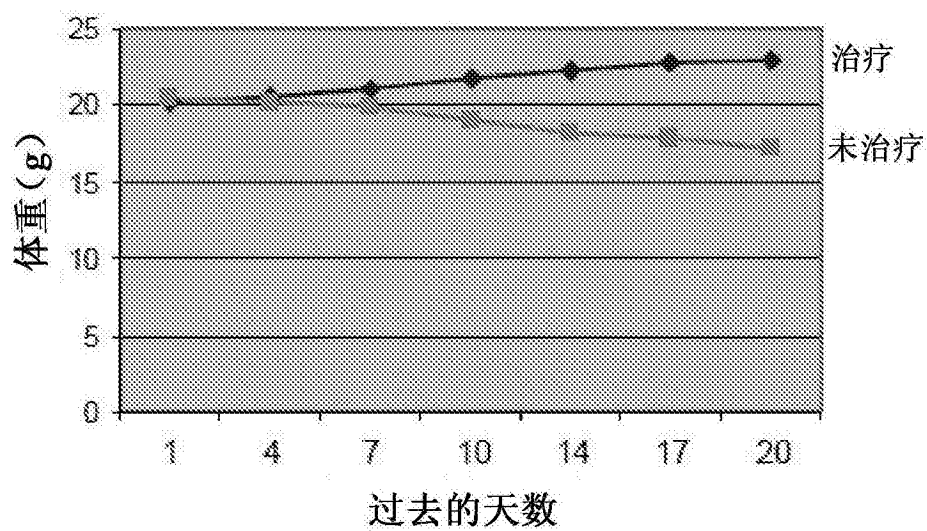


图1(续)

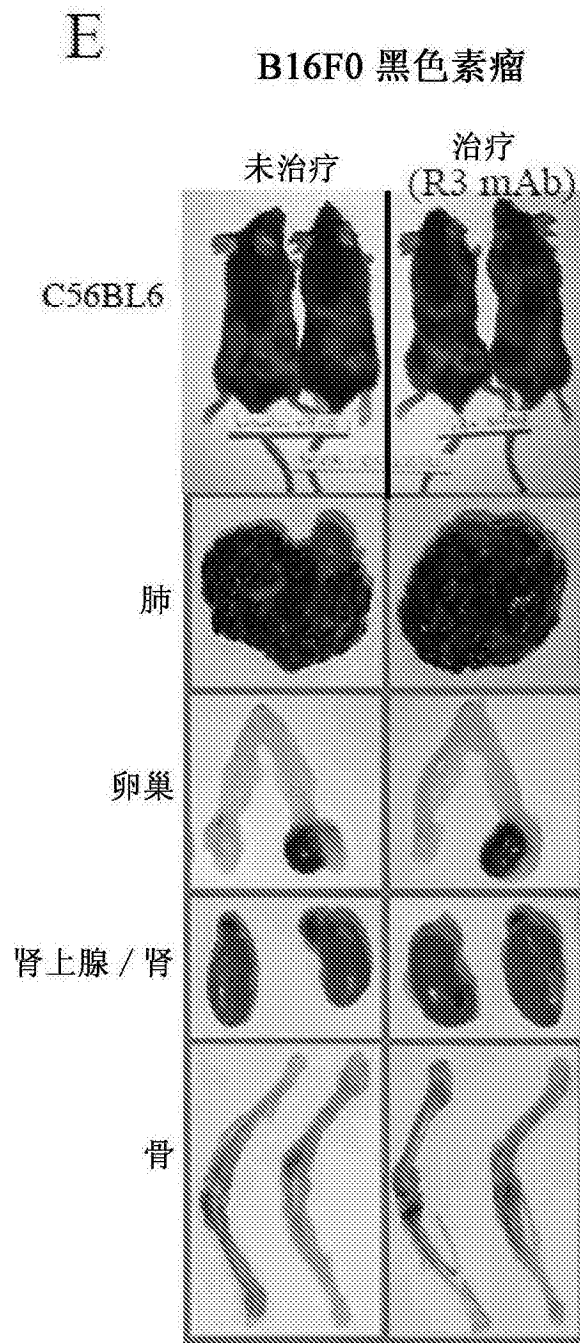


图1(续)

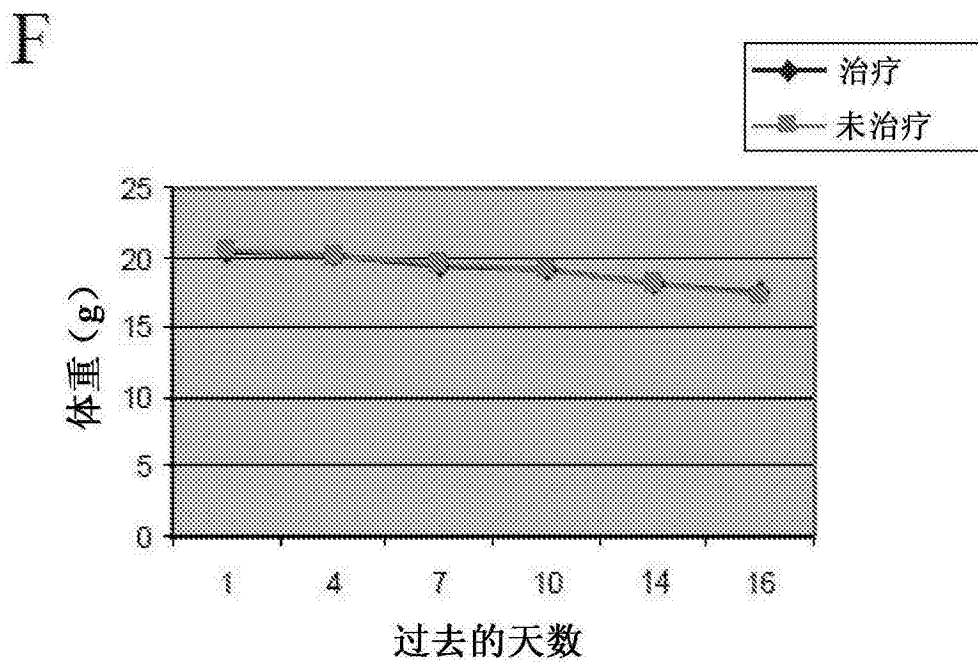


图1(续)

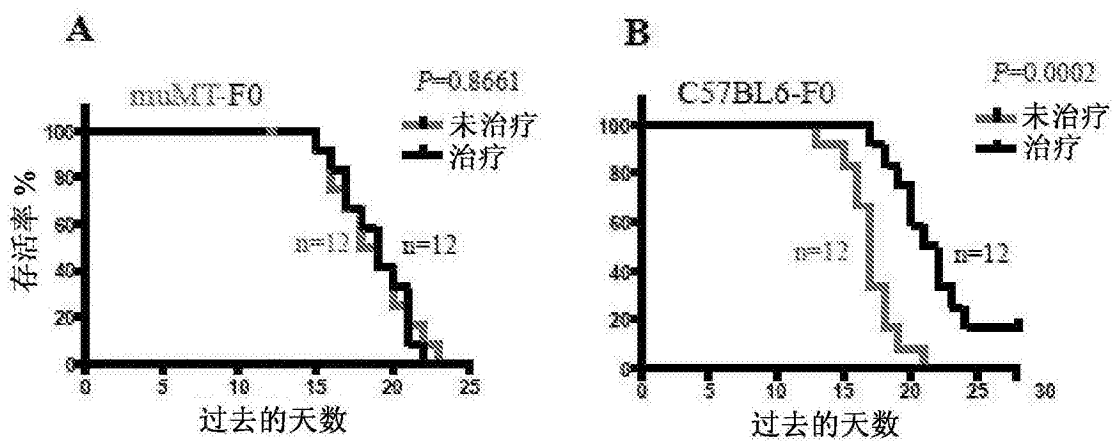


图2

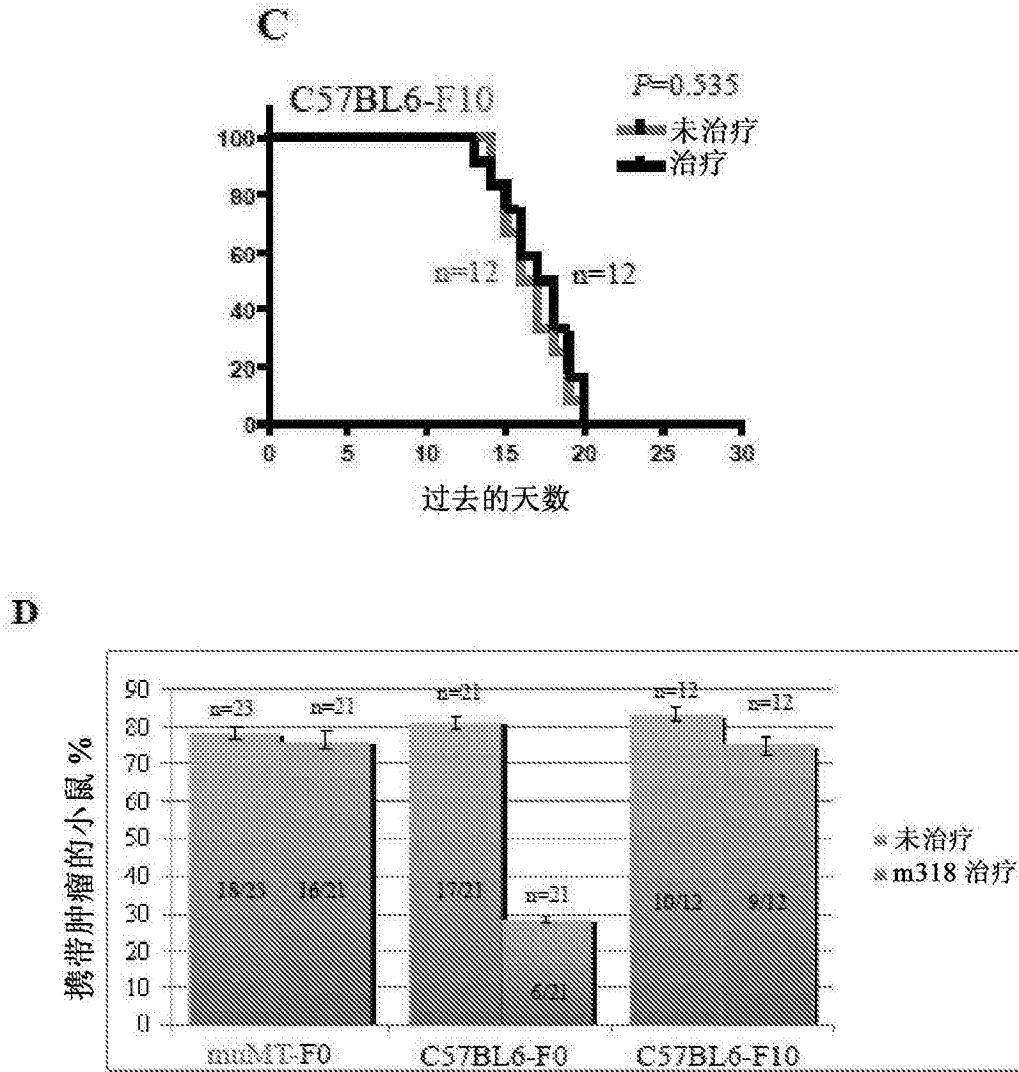


图2(续)

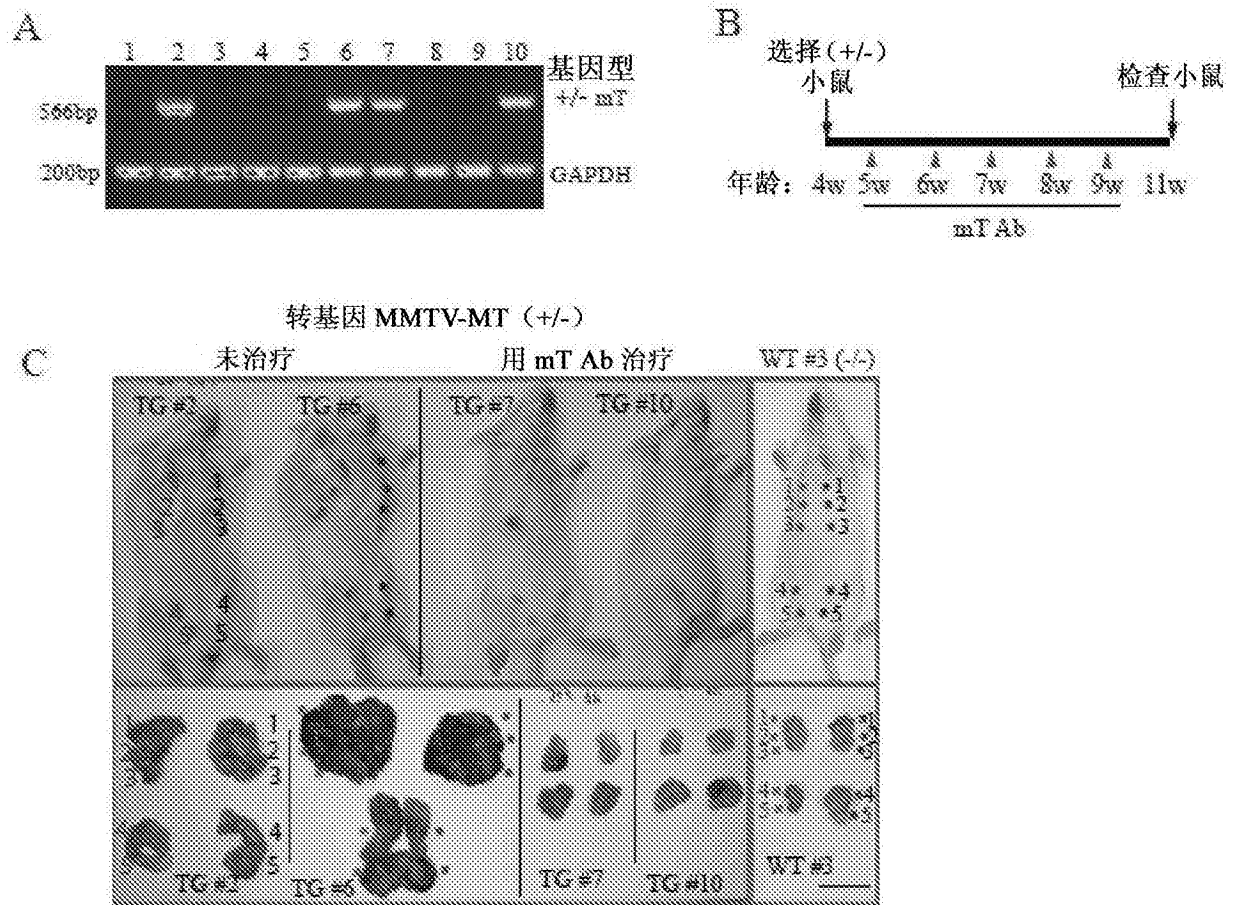


图3

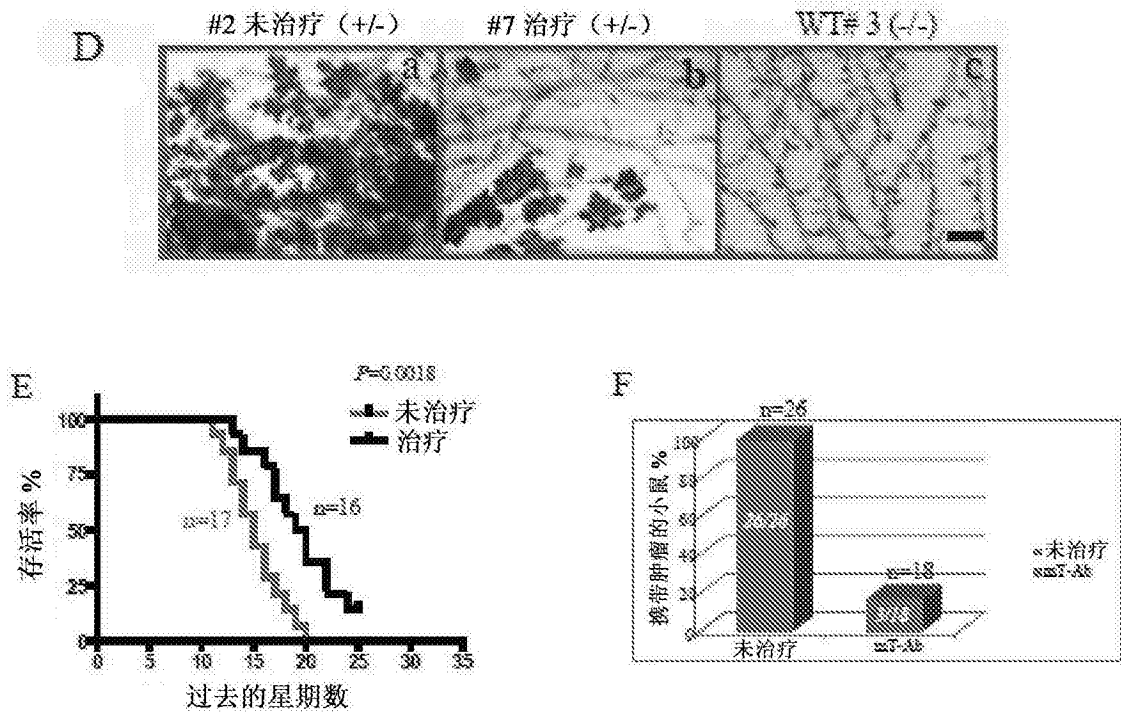


图3(续)

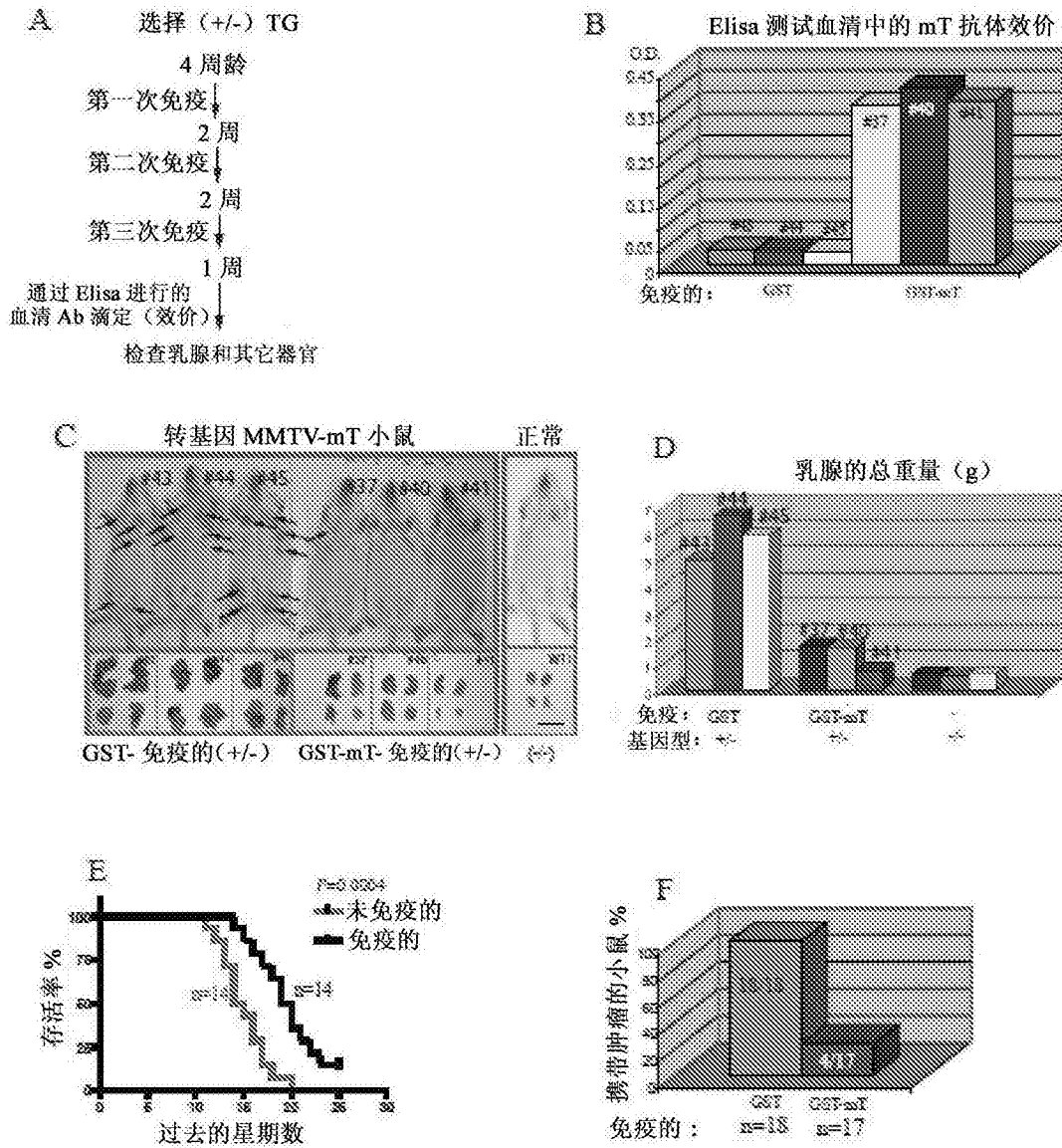


图4

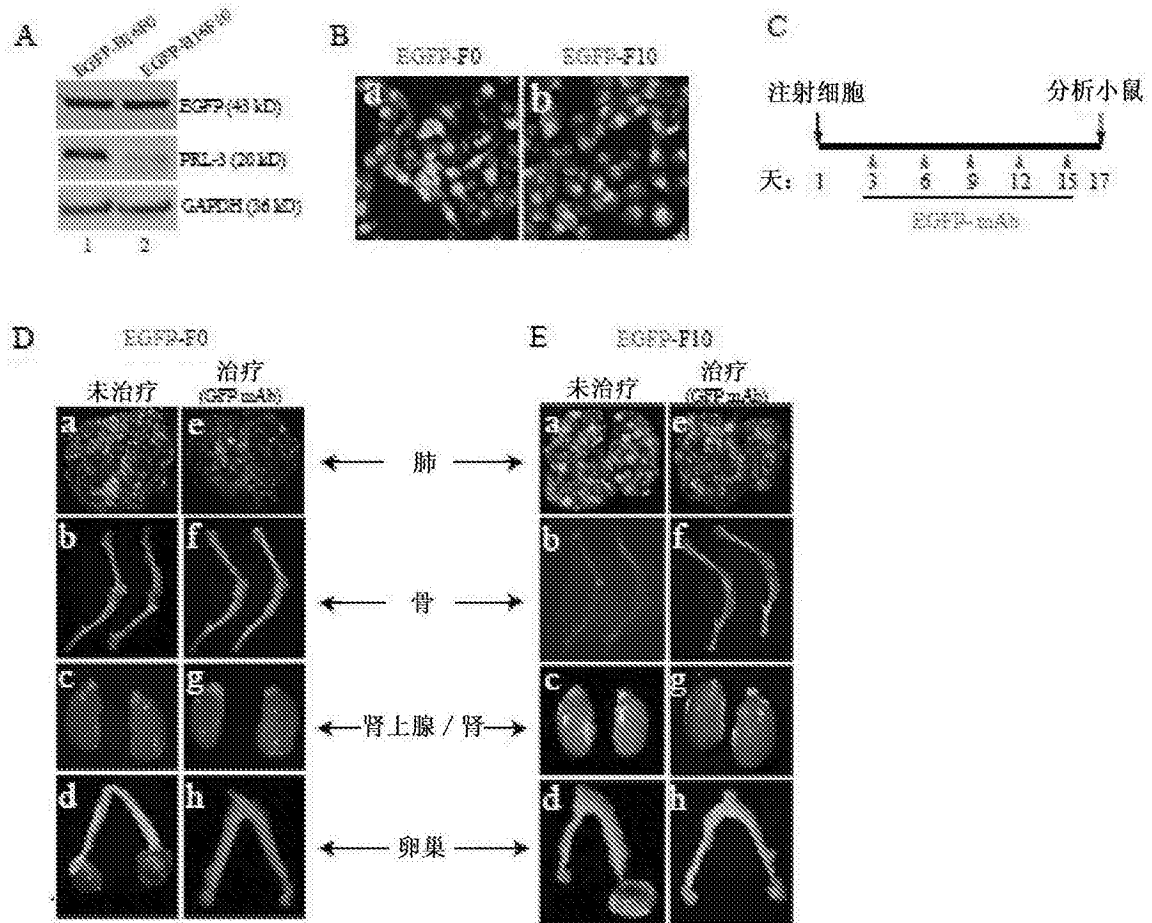


图5

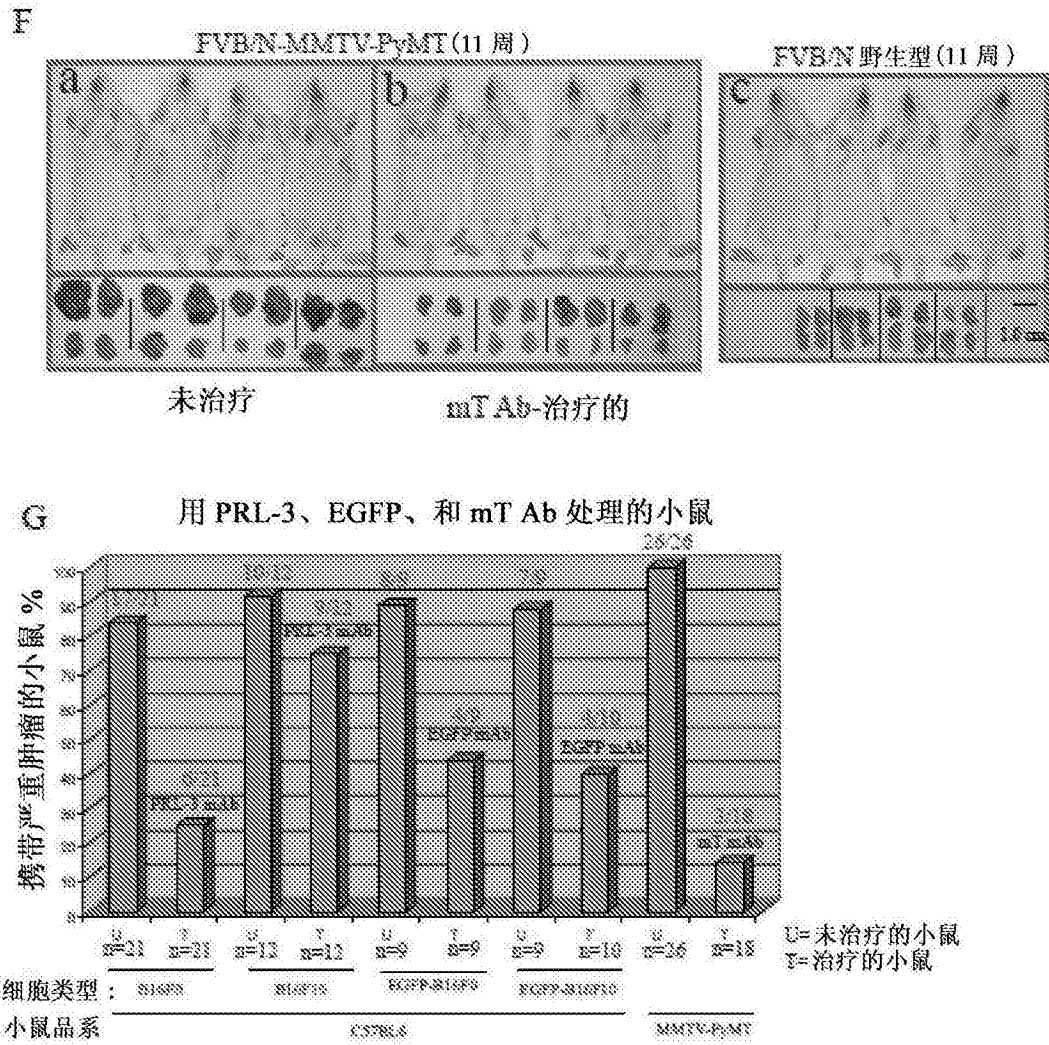


图5(续)

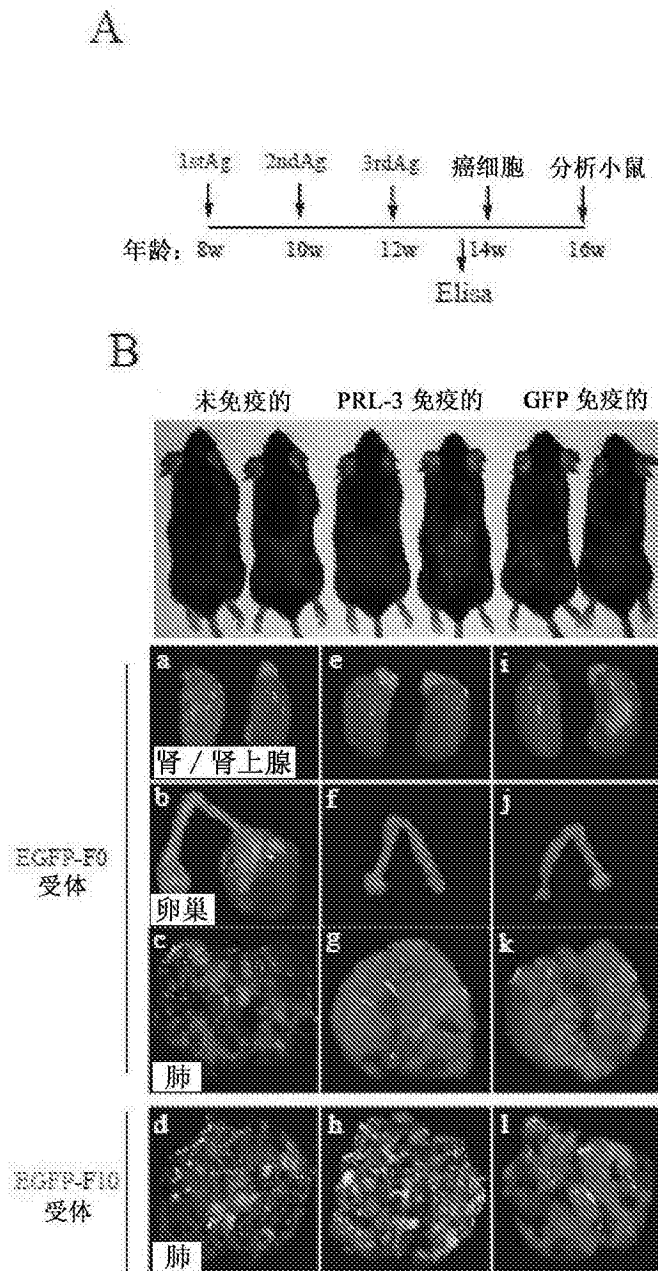


图6

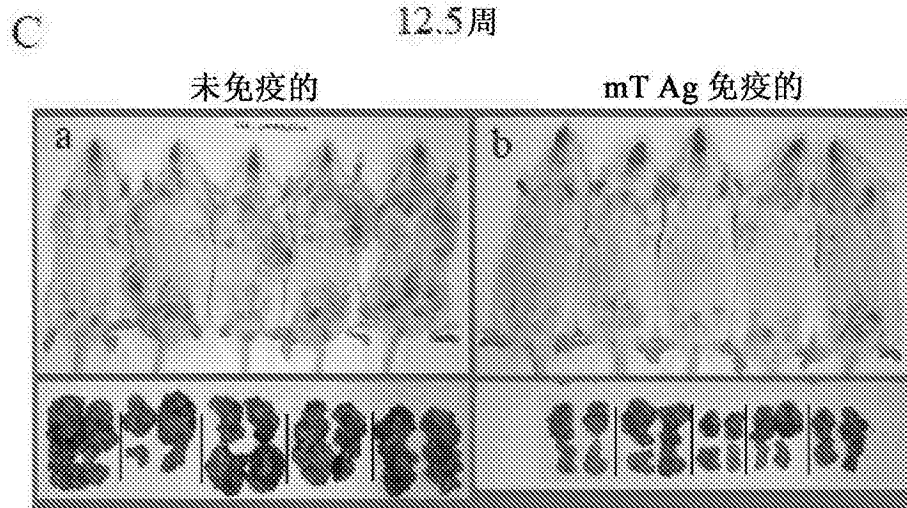


图6(续)

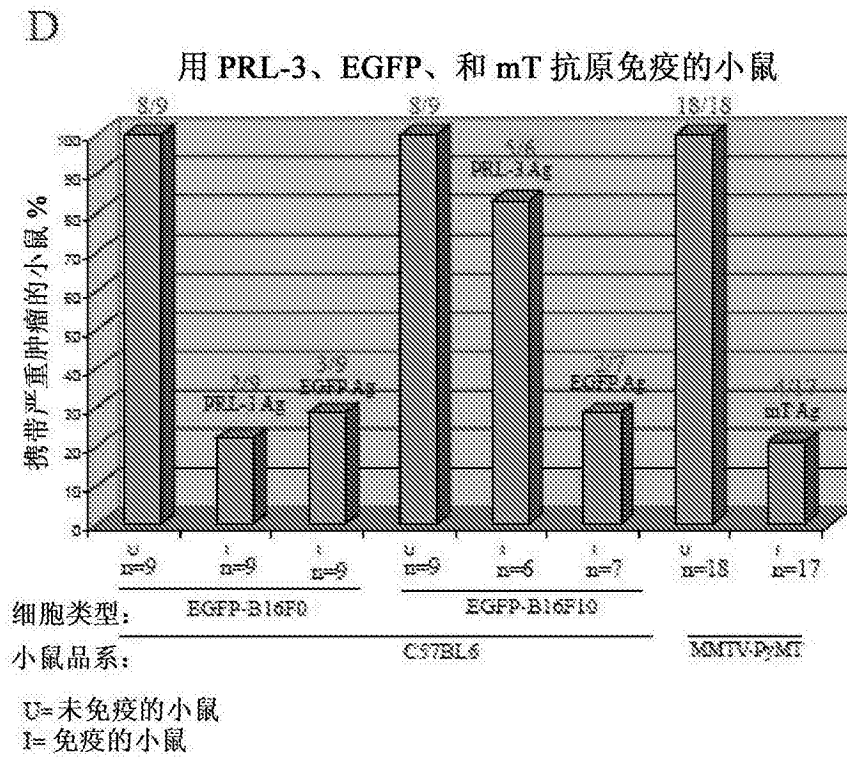


图6(续)

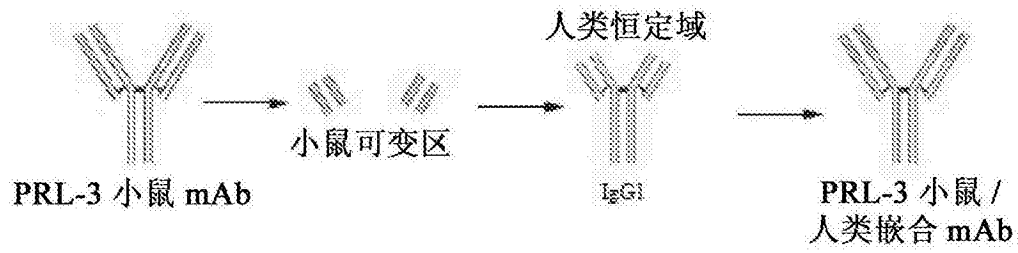
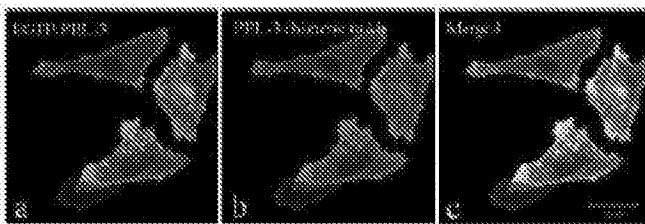
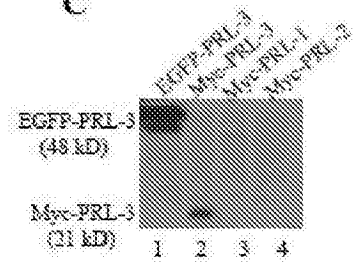
A PRL-3 嵌合抗体构建的概述**B****C**

图7

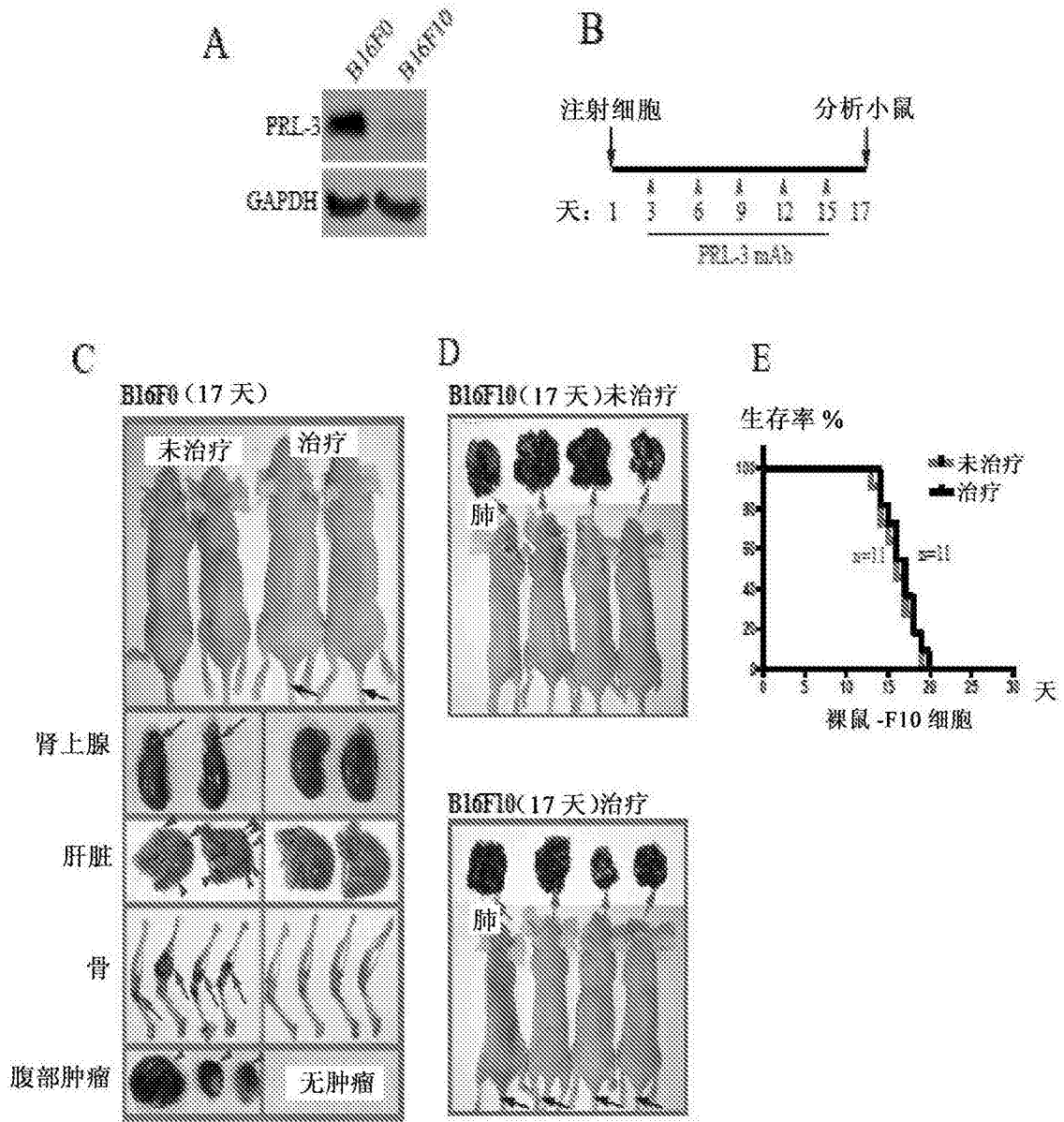


图8

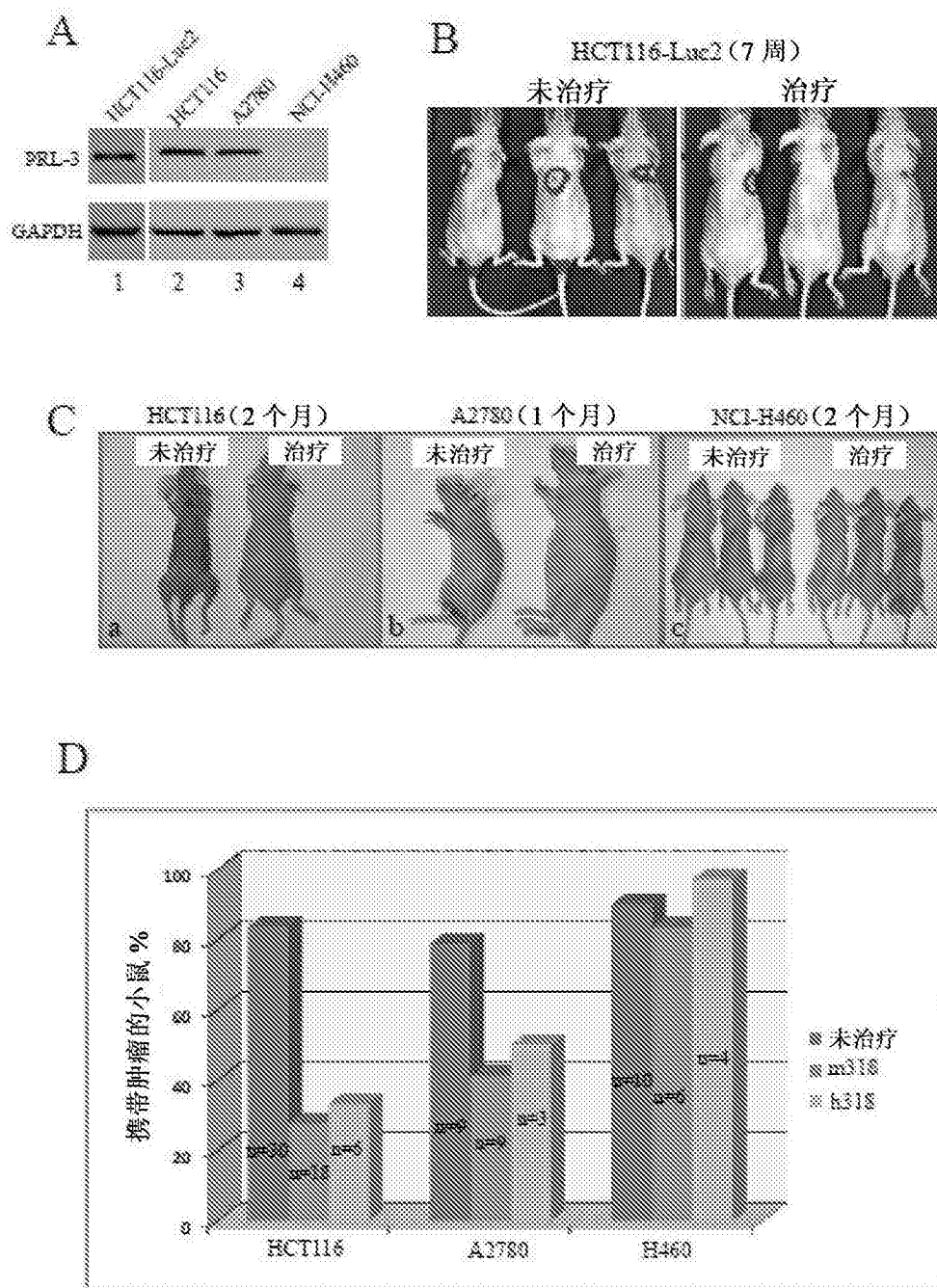
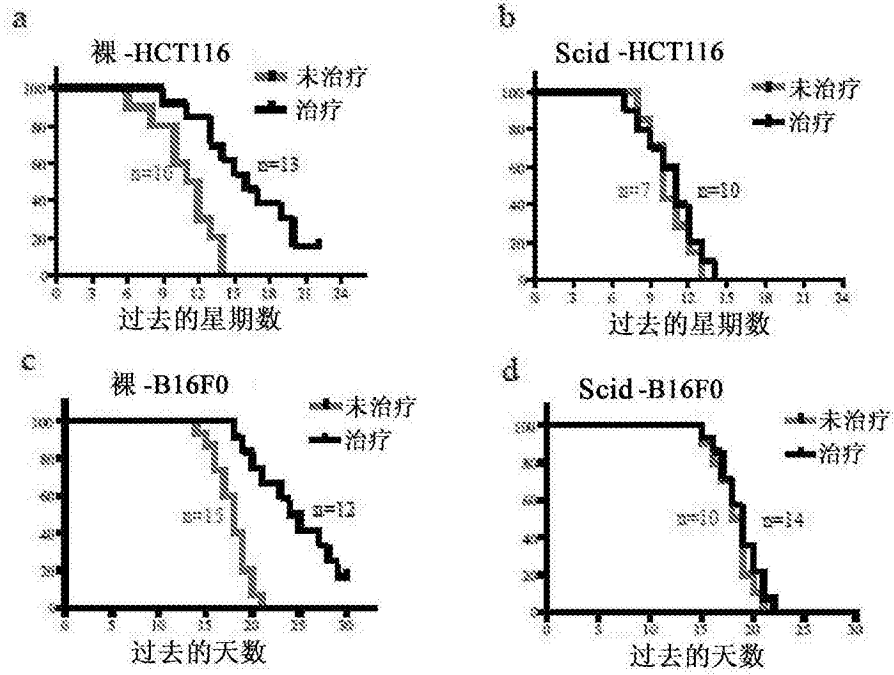


图9

A



B

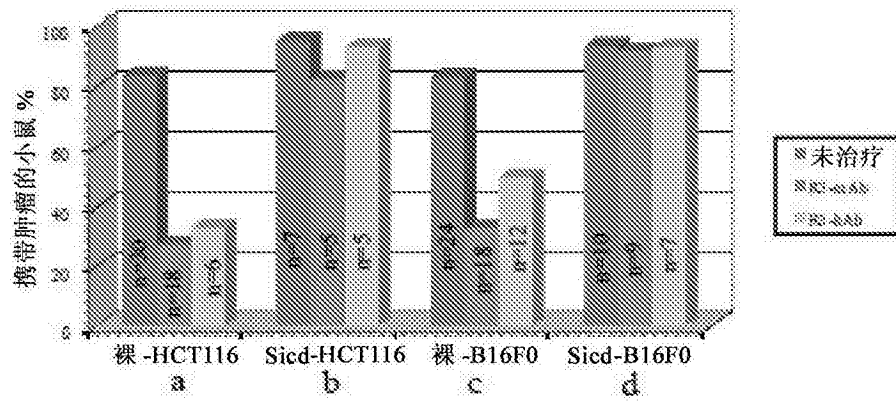
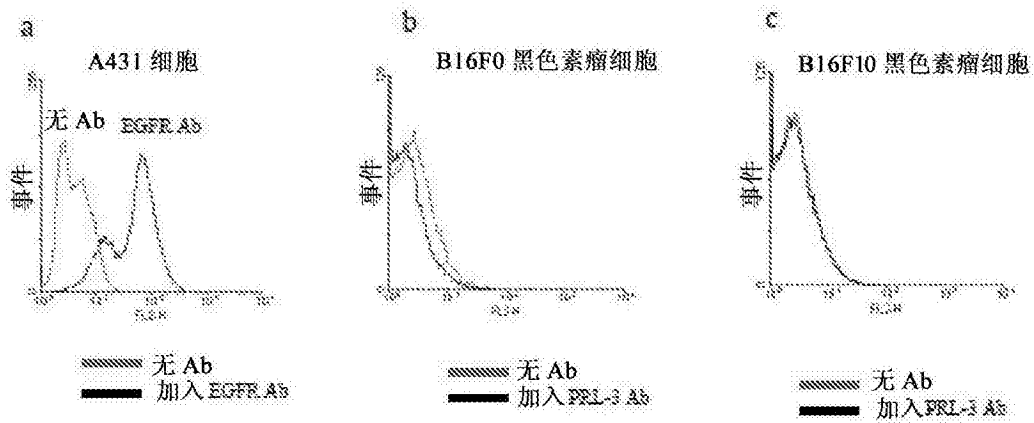


图10

A



B

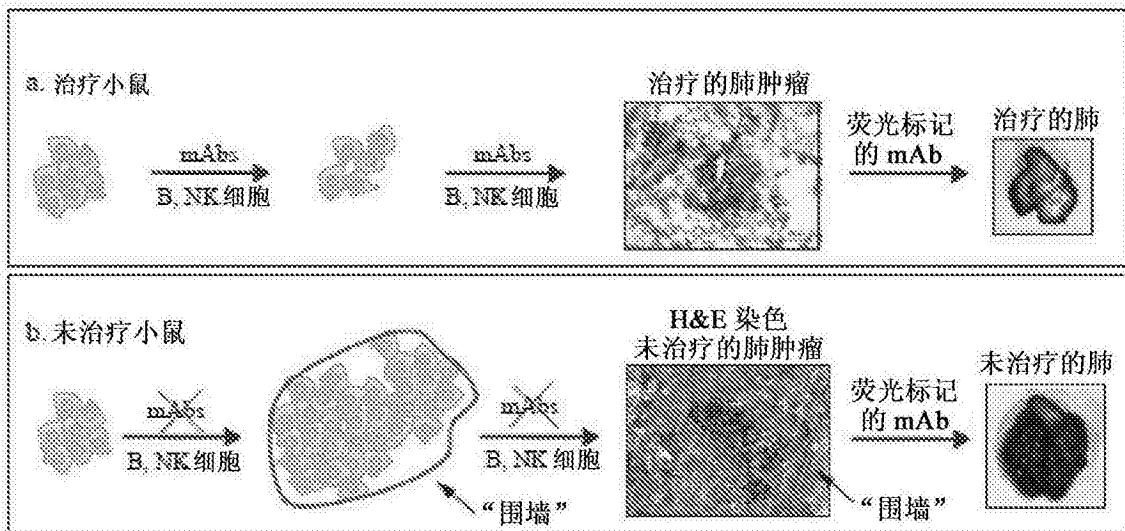
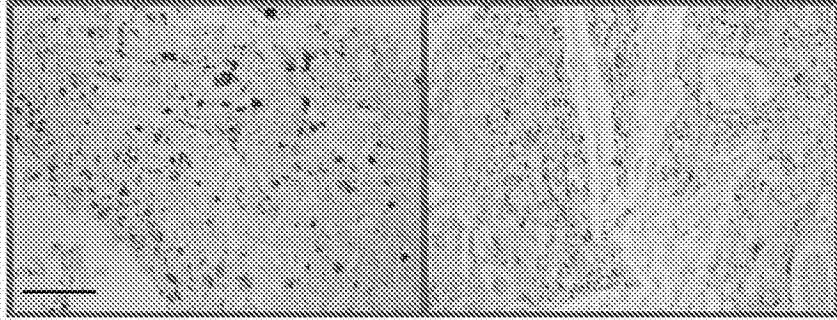


图11

A

鳞状细胞癌

**B**

腺癌

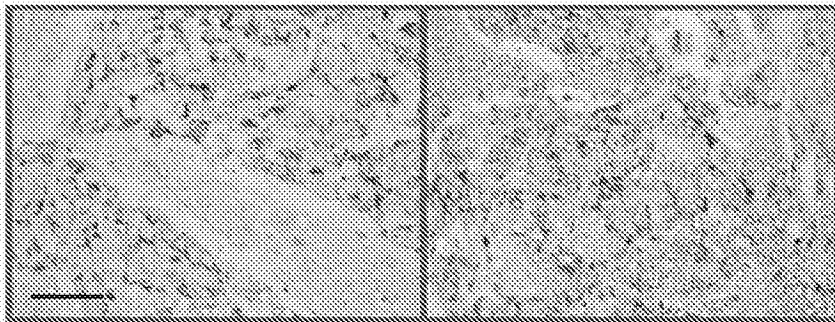


图12

C

人类肺癌中的 PRL-3 表达的总结

肺癌亚型	鳞状细胞癌	腺癌	小细胞癌	大细胞癌	类癌瘤	正常肺
总样本	74	68	12	5	4	8
PRL-3 阳性样本	23	18	1	1	1	0
PRL-3 阳性样本 %	31.1 %	26.4 %	8.3 %	1/5	1/4	0/8

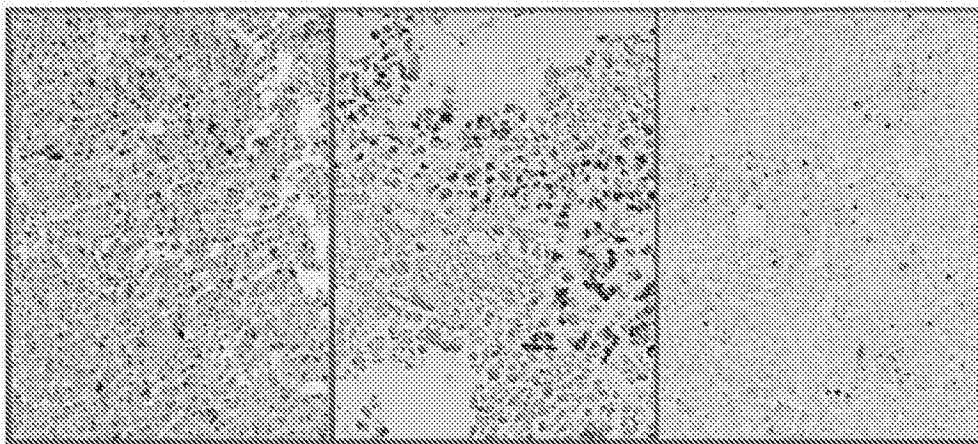
D PRL-3 在 35% 的 AML 中过表达

图12(续)

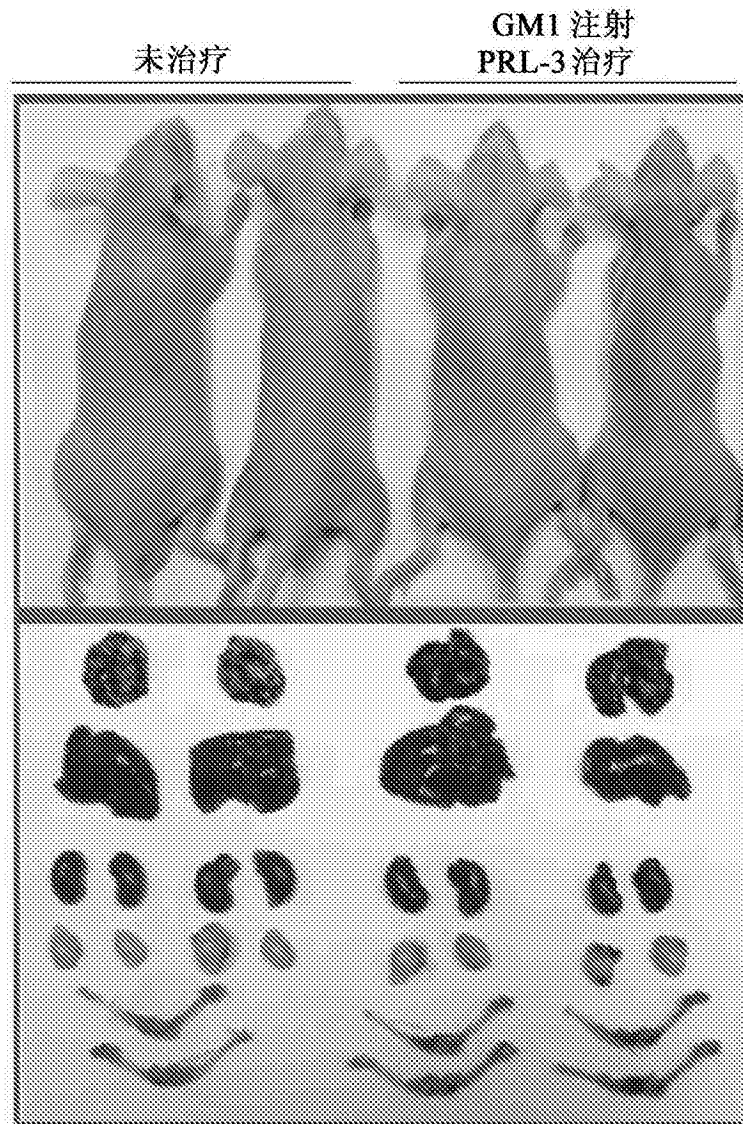


图13

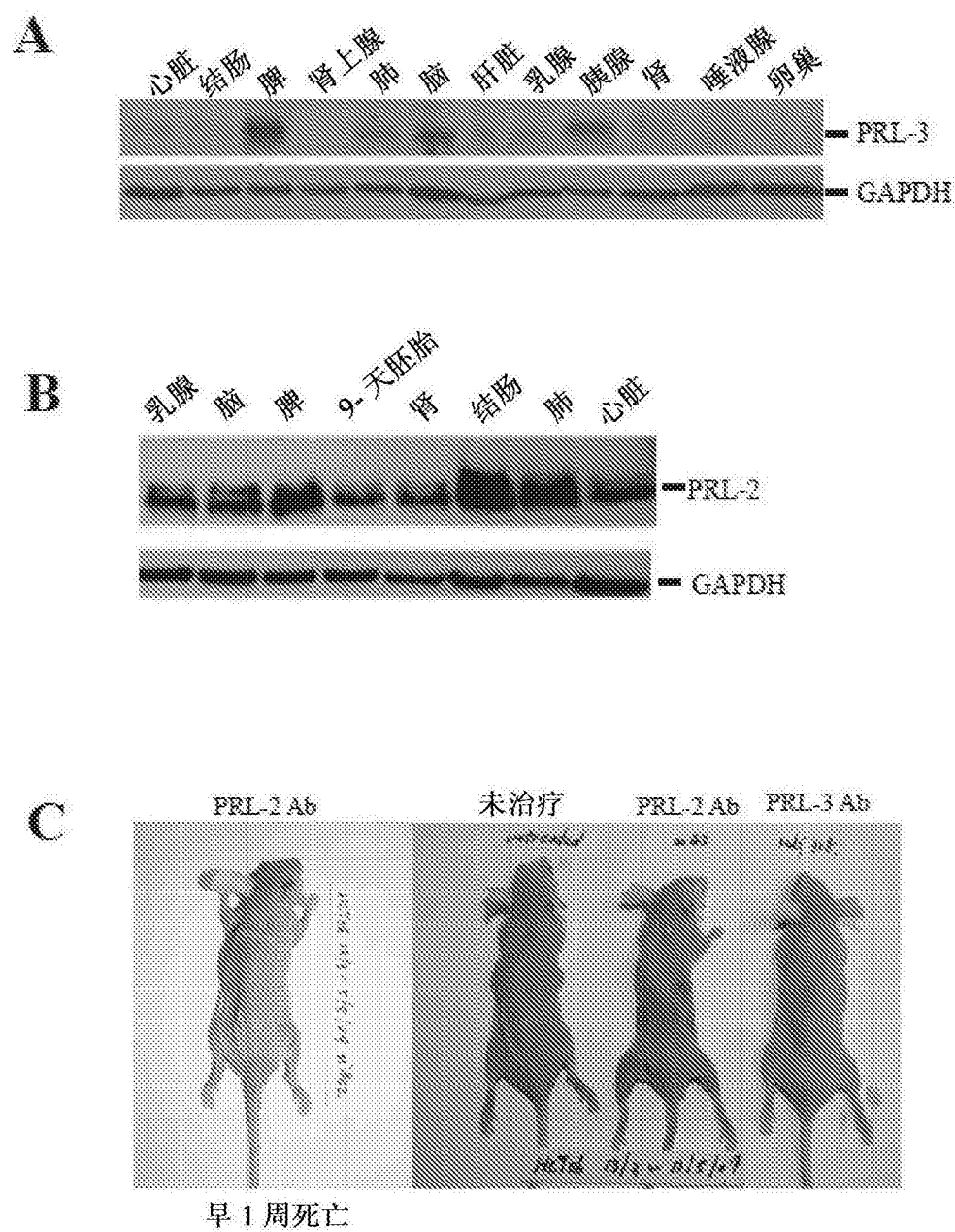


图14

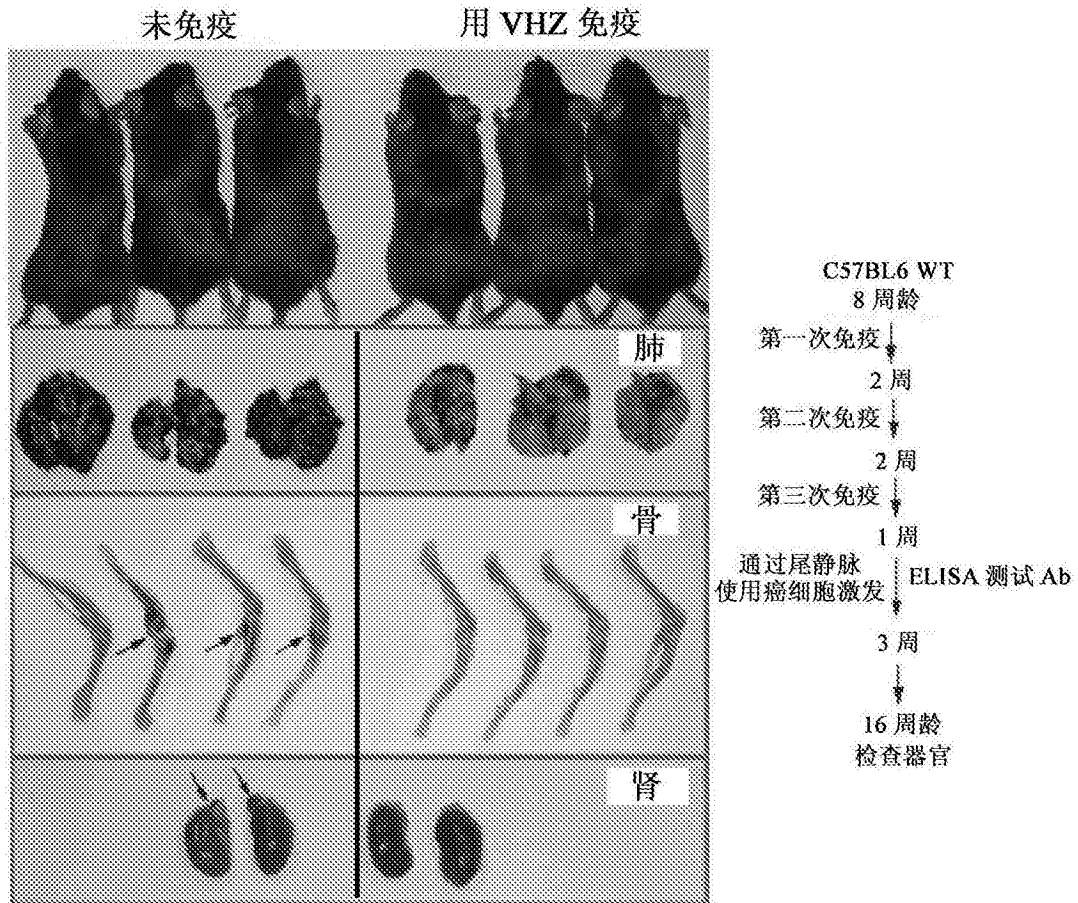


图15